

国立水俣病研究センター年報

第 5 号
昭和59年度

環境庁
国立水俣病研究センター

昭和59年度年報の発刊にあたって

当研究センターは、水俣病に関する総合的医学研究機関として昭和53年10月に設置され、本年3月をもって6年半を経過いたしました。

周知の如く、水俣病は昭和31年の発生報告以来、未曾有の公害疾患として内外の関心を集め、多数の大学、研究機関等において本病に関する調査・研究が実施されました。現在までに膨大な資料と貴重な知見がえられておりますが、なお未解決な問題も多く残されており、その全貌を解明するに至っておりません。

当研究センターは、開設以来、施設の整備、組織および定員の強化、拡充を図るとともに、センター設立の趣旨および水俣病研究の現状と問題点を踏まえ、水俣病および有機水銀中毒に関する体系的、総合的な調査・研究計画の策定とその実施に努めてきました。また研究員についても、57年度以降、ほぼ定員の充足をみており、研究体制の整備、確立と相俟って、調査・研究活動の着実な進展がみられました。

なお、本年3月末には、動物実験棟整備年次計画に基づくS P F (Specific Pathogen Free) 動物飼育実験室が完成いたしました。来年度以降には、中・大動物実験棟およびその関連施設の建設も予定されており、有機水銀による慢性中毒実験の推進が期待されています。

この年報は、59年度における当研究センターの活動状況を多方面の方々に御理解いただくため、その概要を第5号としてとりまとめたものです。

水俣病をめぐる諸問題は極めて深刻であり、センターをとりまく環境にも厳しいものがあります。私共はこのような状況に慎重かつ適切に対処し、調査・研究活動の一層の推進をはかり、水俣病の解明に努力する所存です。今後とも御支援と御協力を賜りますようお願い申し上げます。

昭和60年5月

国立水俣病研究センター

所長 黒子武道

目 次

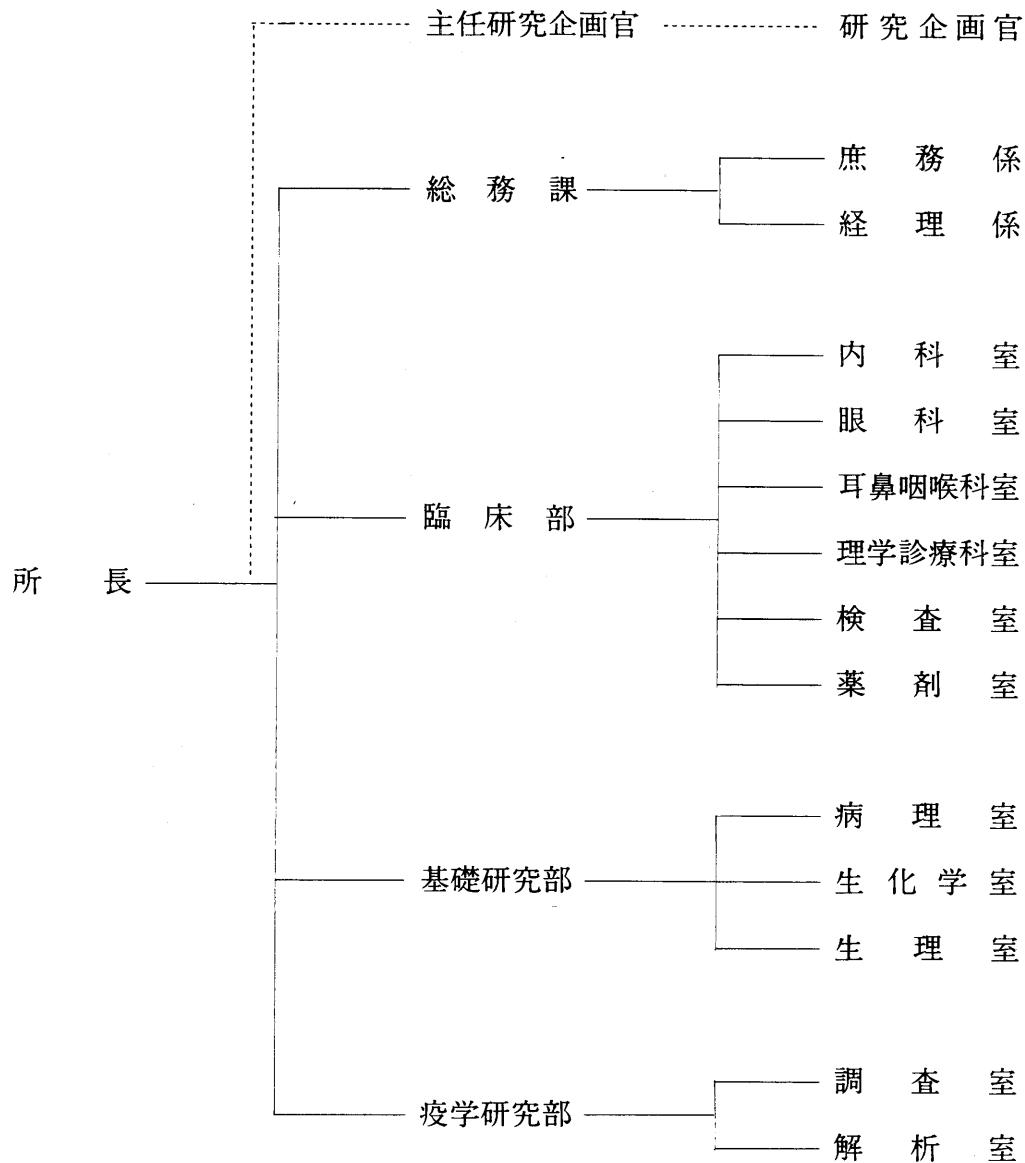
1. 組織構成	1
1. 組 織	1
2. 職員構成	2
2. 調査研究	3
1. 臨 床 部	3
2. 基礎研究部	11
3. 疫学研究部	17
3. 所内セミナー記録	19
4. 水俣病に関する総合的研究班・国立水俣病研究センター 合同ワークショップ記録	28
5. 研究発表一覧	73
1. 臨 床 部	73
2. 基礎研究部	77
3. 疫 学 部	79
6. 国立水俣病研究センターの概要	84
1. 予 算	84
2. 定 員	84
3. 主要施設整備状況	85
4. 主要機器整備状況	86
5. 図書および文献等の整備状況	87
6. 施設配置図	88
附1. 人事異動	89
附2. 主な来訪者	90

1. 組織構成

1. 組織

国立水俣病研究センターの組織は、研究部門としての臨床部・基礎研究部・疫学研究部と事務部門としての総務課との3部1課11室2係からなっており、昭和59年度末の定員は26名で、今後当初構想の38人体制へ向けて逐次拡充を図ることとしている。

なお、運用で主任研究企画官及び研究企画官を設置し、センターの所掌事務のうち重要事項を掌らせている。



2. 職員構成 (昭和59年度末現在)



定員 運用

2. 調査研究

1. 臨床部

研究の概況

臨床部は水俣病患者の経過観察を含めた症候学的研究及び治療法の研究を中心に、水俣病に関する臨床医学的調査、研究を実施している。

主要な研究テーマと進捗状況

1. 水俣病の病像に関する研究
2. 水俣病の治療法の開発に関する研究
3. 水俣病症候の客観的評価に関する研究
4. 有機水銀中毒症の臨床生化学的研究

水俣病発生後約30年を経過した現在では、急性激症型や重症型水俣病の発生はなく、新たに見られる水俣病患者は慢性軽症水俣病である。その臨床症状は重症型ほど典型的ではなく、診断も容易ではなくなりており、その病像を明らかにする上でも慢性軽症水俣病の各症候に対する客観的評価方法を確立することが重要となっている。この観点より59年度は聴性誘発反応、体性感覚誘発電位、サーモグラフィー、歩行解析等の電気生理学的手法を用い、水俣病症候の客観化の方法を研究し有用な結果を得た。

一方重症型で発症した水俣病患者も慢性経過をたどり、神経症候も固定化してきており、その治療法はリハビリテーションが中心となっている。このため水俣病に最も有効なりハビリテーション技術の開発が急務であり、その研究を推進し一部胎児性患者で効果が認められた。

また水俣病の患者は殆どが在宅患者であるが、在宅療養の実態は明らかでなく、在宅における機能障害、医療状況の把握が重要であり、この点について在宅訪問を中心に行い水俣病患者の療養状況が明らかになった。更に水俣病においては、従来とかく神経症状が研究の中心となっており、他臓器障害の系統的研究がなされていなかったが、本年度は腎障害、骨代謝の面より研究を行った。

有村 公良

日常生活動作面から検討した現在の水俣病患者の機能障害

堤美喜子 有村公良

水俣病患者のリハビリテーション技術(理学療法)の開発をはかるために患者の日常生活動作の評価を行い、その結果より水俣病患者の現在の身体機能障害について検討した。

患者の高齢化に伴い臨床症状は発症時に比べてかなり変化してきており、今回は精神状態評価を併用しながら独自の日常生活動作評価用紙を用いて身体機能障害の評価を試みた。

対象は、昭和59年9月から昭和60年2月にかけて水俣病入園施設明水園に入園していた62名の水俣病患者(平均年齢71.1歳)で、その中に7名の胎児性水俣病患者(平均年齢27.1歳)が含まれていた。

後天性水俣病患者においては、整容、食事、衣服の着脱、排泄、入浴、移動、起坐起立等の基本動作では全体の半数近い患者が介助を要しており、その原因として二次的な合併症である脳血管障害、パーキンソン病、O.P.C.A.、変形性関節症等による運動麻痺や筋力低下、四肢の拘縮・変形があげられ、発症時の水俣病特有の小脳性失調症状は軽減しており、それが直接、運動機能を阻害しているとは考えられない。むしろ意識障害、意欲の低下、痴呆といった要素が大きな原因となっていることがわかった。さらに基本動作が一応自立している患者では手指の巧緻動作に障害があり、手指の感覚障害と手指の対立動作の運動障害、またその他に眼の障害が主な原因と考えられた。先天性水俣病患者では知能障害及び、C.P.に類似した中枢神経運動麻痺が強く、この障害は日常生活動作全般にわたっているが、中でも特に移動、排泄、衣服の着脱に介助を要する患者と、運動障害はほとんど認められず知能低下が主で、助言や指示を与えればほとんど自立に近い患者の二群にわけられた。

発症時の水俣病は歩行動作と手指の巧緻動作の障害が強く運動失調と不随意運動がその主な原因との報告があるが、現在の水俣病患者では従来の小脳症状は軽減して中枢性運動障害と末梢性運動・感覚障害とさらに廃用性麻痺が混在した症状を示し、それに二次的に起きた合併症と老齢化に伴う精神障害が加わり日常生活動作全般にわたる障害を示している。また依然として、胎児性水俣病患者では中枢性運動麻痺と知能障害が主な原因となっている。変化してきている現在の水俣病の症状に即した独自評価用紙を作成し、新たな問題に対処しなければならない。

水俣病患者の在宅訪問

堤美喜子 有村祐子

現在、水俣病患者は発生以来長い年月を経過しているため、自覚症状や臨床症状は、発生時に比べかなり変化しているといわれている。しかし病院や施設等に入院していない、いわゆる自宅療養中の水俣病患者の現状についてはこれまでほとんど知られていない。そこで自宅療養中の水俣病患者の現在の日常生活の実態、患者の訴え、および健康状態、治療方法、問題点等を把握し明らかにするとともに、さらには現在の水俣病患者により適したリハビリテーション指導を行うことを目的として在宅訪問を実施した。

⑧中脳横径 ⑩第四脳室横径 ⑪第四脳室縦径 ⑫橋横径 ⑬ pre pontine cistern 縦径の各部位を実測し、(a)各々の部位を水俣病群と正常対照群の各年代で対比し有意差の有無の検討を行ない、かつ(b)上記にて有意差の認められた①②③⑦および水俣病の病理学的所見の特徴を反映すると考えられる⑩の5項目を抽出し、60、70、80才代を age matchさせ判別分析を行なった。

水俣病群と正常対照群の各部位の測定値の年代別対比では、特に70才代で多くの部位に有意差がみられたが、全ての年代に共通して有意差のみられる特異な所見は得られなかった。しかし age matchされた60、70、80才代の前記5部位の計測値を用いた判別分析では正常対照群と水俣病群を72.9%の確率で正しく判別し、この判別は5%以下の危険率で有意であった。

以上の事よりCTによる水俣病の補助診断においては①age matchingが必要であること②各指標を組合せた判別分析が有用であることが結論された。

CTスキャンの指標は、いずれも特異性が低いので総合判断にあたっては、慎重な評価が必要である。

③ 胎児性水俣病のCT所見

浜田陸三^{*} 吉田義弘^{*} 黒子武道^{*} 桑野麗雄 三嶋 功 伊藤義廣 畠中裕幸 井形昭弘
第76回日本神経学会九州地方会(1981,12,久留米)

11例の胎児性水俣病患者を対象にCTスキャンの検討を行った。

水俣病は有機水銀暴露の時期に応じて病態が大きく異なり、胎生期に暴露を受けると、成人期における様な選択的障害は認められず、びまん性に障害されるとされている。CTスキャン上もcorticalおよびsubcorticalのびまん性萎縮が主体で成人型の様な選択的な障害は認められなかつた。成人型水俣病のCT所見はいくつかの報告はあるが、胎児性水俣病のCTは未だ報告がない。

年齢別では、60歳以上が全体の67%を占めており、高齢者が多く、一方20～30歳代の胎児性および小児性水俣病患者は20.5%を占めていた。家族構成は1人暮らし6.8%、夫婦または親子の2人暮らし36.5%、家族と同居は56.8%であった。看護状況は、1人暮らしにおいては、近くに家族がいてよく看護されている患者が半数であるが、残りの患者も緊急の場合は、近くにいる家族に連絡し対処可能な状態にあった。また2人暮らしの家庭でも、どちらかが急病やその他緊急の場合等には近在の家族が対処可能であった。

主訴は、高齢者が多いため高齢化に伴うと思われる症状が多く、いわゆる水俣病に多く見られる症状を訴える患者は、さほど多くはなかった。療養状況は、全面的にADLに介助を要する患者は少なかった。一方ほとんどの患者は定期・不定期に外来通院または往診を依頼しており、鍼灸院に通院あるいは往診を依頼している患者も比較的多かった。更に自分で治療機器を購入し疾病に積極的に取り組んでいる患者も見られたが、現時点では対症療法が主であることがわかった。以上の事より次の事が明らかになった。①患者は高齢者が多く、看護者も高齢で充分な看護ができず今後患者の看護に加えて、看護者の健康管理、看護指導が必要である。②胎児性・小児性水俣病患者も比較的多く、これらの子供をもつ親にとって、現在の看護の困難さ、また看護者自身の健康状態に加えて子供の将来の事が大きな問題である。この事は、①の高齢者問題と合わせて医療面のみならず社会的な面での援助も必要と思われた。③患者は現在のみならず将来の健康状態に不安を抱いており、健康管理の目的で定期的な診察を望んでいる患者も多い。④水俣病本来の症状を訴える患者は少なく、高齢化に伴うと思われる症状を訴える患者が多く見られたことでは、水俣病患者の医療も、水俣病の症状に必要な治療のみならず、高齢化による症状に対しての治療も今後充分考えていかなければならないと思われる。

今後さらに訪問を重ね、患者個々に合ったより具体的な援助・指導法を考案し、行っていくと共に他医療機関、関係各方面との協力も密にしていかなければならぬと考える。

胎児性水俣病患者に対する末梢性筋弛緩剤ダントリウムの効果

上土橋浩 吉田義弘 堤美喜子

胎生期に有機水銀の曝露を受けた、いわゆる胎児性水俣病患者はその症状が後天性脳性麻痺と酷似している。この胎児性水俣病患者のうちの大部分が痉性麻痺を伴っているため、ADLやりハビリテーションを遂行する上で支障となっている。この胎児性水俣病患者に対して末梢性筋弛緩剤であるダントリウム(Dantrolene Sodium)を投与し、その効果を検討した。

対象とした水俣市立明水園に入園中の胎児性水俣病患者6名(25～27歳、男2名、女4名)に対して、末梢性筋弛緩剤であるダントリウムを投与し、投与前後で日常生活動作や自覚的な症状改善度、筋トーヌス、腱反射、不随意運動、言語障害などを比較検討した。さらに投与前後で表面筋電図や歩行解析システムによる評価も行った。ダントリウムは25mg/日投与から開始し、一週毎に25mgずつ增量し最高150mg/日までとした。

その結果ダントリウムを投与した全例で、三週間目ごろより筋トーヌス、腱反射、クローヌスが軽減され、自覚的に手指や四肢の運動に改善を認めた。歩行が可能であった2例は、ともに歩行

障害に改善を認めた。アニマ製大型三次元フォースプレートを用いた歩行解析でも、歩行時の大いな揺れや最大床反力が減少しているのが確かめられた。ジストニー様の不随意運動が見られた一例では、ダントリウム投与後にこの不随意運動が、自覚的にもまた表面筋電図からも軽減しているのが認められた。

以上より、ダントリウムを投与した胎児性水俣病患者で持続性の筋緊張の軽減と同時に、日常生活動作や運動に改善が見られた事から、リハビリテーションを遂行する上で本剤は有効な薬剤となり得ると思われる。

水俣病患者の歩行障害に関する研究

若宮純司 有村公良

運動障害の重症度を客観的に評価することは診断上ならびに治療上重要であるが、評価すべき動作が複雑であり、運動系以外にも感覚系や精神的因子が加わるため客観的評価や定量化は困難で、動作解析の多くは動作各要素の計測か定性分析に終わっていた。そこで歩行解析により歩行障害の客観的評価を試みた。

軽度の歩行障害を有する水俣病患者13名（平均年齢70.8才）、背髄小脳変性症患者4名（平均年齢38.3才）、および対照者として成人健康男子9名（平均年齢59.2才）を実施対象とした。

方法はアニマ製歩行解析システムを用いて自然歩行での前後左右の足の間隔・歩行周期・立脚時間・遊脚時間・両脚支持時間・前後左右方向の最大圧を求め、さらに連続3stepでリサージュ波形が運営した部分と全体との面積比を計測し、歩行のパターンおよび動搖性について検討した。

結果は水俣病患者・背髄小脳変性症患者ともに対照者に比し広いストライドで歩幅が小さく、左右方向に力を加える歩行パターンをとるが、水俣病患者ではこれ以外に前後方向にも力が加わり、接地時間が長くなる傾向があった。

以上より歩行障害が軽度の場合、歩行期の変化より歩行型の変化の方が強いことがわかった。そこで前後左右・左右垂直二方向の床反力合力におけるリサージュ波形の変化量が多いことに着目し、歩行パターンの動搖性の指標として、連続3stepでリサージュ波形が動搖した部分の面積が波形全体にしめる割合を求めたところ、歩行障害に応じて面積比は大きくなっていた。したがって、歩行期に変化のない軽症時にも歩行パターンの動搖性は存在し、これを解析することにより軽症水俣病患者における歩行障害を客観的に評価することが可能であると考えられた。

本論は、昭和59年度水俣病に係わる調査研究合同討議（昭和60年2月、東京）において発表した。

水俣病症例における聴性中間反応の検討

大堀八州一 古田 茂 大山 勝

水俣病の聴力障害は主に後迷路性障害と言われている。しかし、A B Rによる脳幹部の障害の

検討では、胎児性水俣病を除き、正常者との間で特に有意の差は証明されていない。そこで我々は ABR よりもより高位中枢の聴覚誘発反応である聴性中間反応 (MLR) について若干の検討を行った。MLR は Na、Pa、Nb、Pbなどの波よりなり、その起源は一般に Na は内側膝状体、Pa は側頭葉聴皮質に関与すると推定されている。対象は明水園の水俣病認定患者11名20耳で、コントロールは耳疾患以外で鹿児島大学耳鼻科に入院した10名19耳である。検査に先立ちあらかじめクリック音での域値を求め、域値上40dBの刺激強度で検査を行った。誘導は耳朶一頭頂、解析時間は100 msec、加算回数は1000回とした。また、1耳につき2回のトライアルを行った。MLR 各波の出現率は対照群、水俣病群でそれぞれ Na : 97.4%、90.0% Pa : 97.4%、85.0% Nb : 71.0%、55.0% Pb : 36.8%、35.0% といずれの波でも水俣病群でやや出現性の低い傾向がみられた。各波のピーク潜時はそれぞれ Na : 19.4 ± 2.2 msec、19.2 ± 3.7 msec Pa : 37.6 ± 5.3 msec、36.3 ± 4.4 msec Nb : 61.9 ± 11 msec 56.5 ± 9.2 msec を示し、両群の間に有意の差は認められなかつた。しかし、水俣病群ではいづれの波でもやや潜時の短縮傾向を示した。胎児性水俣病4例では、催眠剤を使用した例もあり波形の鈍化等の影響を受けたものの、全例に Na、Pa を認めた。以上の様に、今回の検討では対照群と水俣病群の間に有意の差は認められなかつたが、水俣病群の1例に於て、ABR は正常だが MLR では、1側の Na が出現せず、他側の Na の潜時が明らかに延長しているという興味ある症例を経験した。MLR は、ABR より再現性に乏しく、刺激強度により筋原性の反応が混入する事などから、未だ十分な検討がなされているとは言えない。しかし今回の検討でも示した様に、Na、Pa についてはかなり安定した出現性がみられ、ABR が正常で MLR が異常な例を検出し得た事からも、MLR は下丘よりもより高位中枢の機能を推測するのに役立ち、診断上有用な一補助手段となり得る可能性がある。

以上の結果は、水俣病に係る調査研究合同討議（昭和60年2月、東京）において発表した。

有機水銀中毒ラットの有機フリーラジカル測定

吉田義弘 上土橋浩 宮本謙一郎 堤美喜子

種々の疾患において組織障害因子として、過酸化脂質およびフリーラジカルが注目されており、今年度、有機水銀中毒ラットにおいて有機フリーラジカルを測定した。

ウィスター系ラット雄、平均体重280 g（生後10週）に、メチル水銀塩酸塩 (MMC) 10mg/kg を連続投与した。投与前と、3日間投与し4日目、6日間投与し7日目、8日間投与し10日目と13日目に屠殺し、迅速に肝、脳、腎をとり出し測定した。各群6匹ずつとし、測定は液体窒素下で行い、ラジカルのトラップ剤は用いなかった。ESR 測定装置は日本電子製 JES-FE1X を用いた。有機 free radical は、g = 2.05 にあるものを定量し、他に、g 値および標準物質から Fe、P450、Mn および未同定の金属 (g = 2.00) をも測定した。定量は、条件を一定にした上で、高さを計測し相対値とした。脳では、有機 free radical g = 2.05 および g = 2.00 に位置する Co 又は Zn と考えられる metal は、メチル水銀投与に従って、低下してくる傾向にはあったが、有意差は認められなかつた。肝臓では、Fe、P450、Mn、free radical、metal (g = 2.00) でメチル水銀投与数量に従って、有意差をもつて低下した。腎臓では、Fe、P450、Mn、有機 free radical、

metals ($g = 2.00$) で、肝同様、投与量に従って有意差をもって低値を得た。

有機水銀中毒ラットで、肝、腎、脳の過酸化脂質が上昇しているという報告が多いが、軽度上昇であるため、組織障害に過酸化脂質がそれ程関与するとは考えられない。今回の結果では、逆に、肝、腎ではMMC投与と共に有機free radicalおよびその他の金属の減少を認め、脳では変化が認められなかった。このことも、また組織障害にfree radicalの関与がないことを示している。有機free radicalは不飽和脂肪酸から生成すると考えられているので、この立場から、更に検討する必要がある。

以上の結果については、水俣病に関する総合的研究班会議（昭和60年2月、東京）において発表した。

水俣病患者における骨代謝の検討

有村公良 若宮純司 宮本謙一郎

水俣病においては従来神経系が主病変であるため神経系以外の臨床医学的研究は少なかった。我々は本年度、慢性有機水銀中毒患者の骨代謝に注目し、生化学的、X線学的検討を加えた。

対象は水俣市立明水園に入院中の水俣病認定患者47名（男12名、女35名）で、年齢は46～91才で平均77.6才であった。対象者全例において、血清Ca、P、ALP、PTH、尿中Ca、P、 β_2 MG、NAG、及び24時間CCR、%TRPを測定し、一部の患者で25OH Dを測定した。骨変化の客観化の目的で microdensitometer とcomputerによる第2中手骨X線像の解析、いわゆるMD法を用い骨萎縮度を測定した。

MD法は自立歩行及び介助歩行など歩行可能な患者40名で測定した。年齢分布とdensitometerパターンでは60才以降ではパターンG～Hという中等度～高度の骨萎縮所見が35.7%と高頻度に認められたが、歩行状態による差は明らかではなかった。

血清CaはPayneの方法により血清アルブミン値で補正を加え検討したが、8例（17.2%）で軽度低下が見られるものの、大多数の例で正常であり、それに比し尿中Caは36例（76.6%）で著明な低下を示した。血清Pは殆どの例で正常範囲にある一方、尿中Pは4例（8.5%）を除き大多数の例で低下を示した。尿中 β_2 MGは10例（21.3%）で異常を認めたが、そのうち高値を示す例はいずれも歩行不能群であった。また%TRPは11例（23.4%）に軽度の低下を認めたのみであった。なお β_2 MGと%TRPの異常群の間には明らかな相関は認められず、またMD法による骨萎縮度と β_2 MG、%TRPとの相関も明らかではなかった。

血清ALPは1例を除き正常値を示し、PTHは1例で低下を認めたのみであり、腎機能ではNAGは6例（17%）で異常を示し、CCRは28例（59.6%）で低下を認め、特に歩行不能群では全例低下していた。一方25OH Dは歩行可能群の中の14例で測定し、7例（50%）で低下を示した。

今回の水俣病認定患者における骨代謝の検討では、血清Ca、Pは比較的正常に保たれているものの尿中Ca、Pの排泄が著明に低下している事、%TRPの正常な例が多い事などより、MD法で見られた骨萎縮は、カドミウム中毒などで見られる腎尿細管機能障害によるものとは考えられ

ず、有機水銀がカドミウムと同様の機序で骨変化をきたすとは考えられなかった。また250HD測定例の半数が低値を示した事などを考慮すると、Caの摂取及び吸収障害による可能性が強く示唆された。しかし今回行った骨代謝の検討は汚染後20年以上経過した時点でのもので、今回の結果のみで有機水銀の影響について結論する事はできない。今後更に非汚染地区を含めた検討が必要と思われる。

以上の結果は、水俣病に関する総合的研究班会議（昭和60年2月、東京）において発表した。

慢性期の水俣病認定患者における腎機能の検討

宮本謙一郎 若宮純司 有村公良

水銀と同族の重金属であるカドミウム(Cd)の中毒では、主に腎尿細管障害が起こり、低分子蛋白尿、腎性糖尿、アミノ酸尿がみられることが知られている。これに対し、有機水銀中毒症である水俣病の急性、亜急性例では、病理所見より尿細管の脂肪変性、近位尿細管上皮への水銀の蓄積がみられ、また慢性期の水俣病患者においても臓器内水銀分布は、腎臓が最も濃度が高い。今回我々は、水俣病患者入園施設である水俣市立明水園に入院している患者46名（男11名、女35名、平均年令76.6才）を対象に尿中蛋白、尿中NAG、血清、尿中 β_2 ミクログロブリン、%TRP 24時間内因性クレアチニン・クリアランス、血清クレアチニン、尿素窒素を測定し、水俣病患者における腎機能を検討した。その結果、24時間内因性クレアチニン・クリアランスは、対象患者中58.7%が低値を示し、血清 β_2 ミクログロブリンは63%、尿中蛋白は65.2%がそれぞれ高値を示した。これに対し、血清クレアチニンは95.7%、尿素窒素は87%が正常範囲で、尿細管機能を示す尿中 β_2 ミクログロブリンは78.3%、尿中NAGは82.6%、%TRPは76.1%が正常範囲であった。これらの結果から、今回対象とした慢性期の水俣病患者における腎機能は、Cd中毒にみられるような著明な腎尿細管障害はなく、また従来報告されている尿中 β_2 ミクログロブリンの上昇を指標とした有機水銀中毒症における腎尿細管障害を支持する所見は認められなかった。これに比し、今回の検討では、糸球体障害を示唆する所見がみられたが、対象が高年者であり、年令の影響等その他の合併症の影響もあり、糸球体障害が有機水銀の影響であるかは今後の検討を要する。更に同年令の対照例の腎機能を測定し、検討を加える必要がある。

2. 基 础 研 究 部

研 究 の 概 況

基礎研究部は、水銀化合物の生体および環境内動態、中毒発現の機序、特にメチル水銀による機能ならびに器質障害の機構を明らかにするため病理学的、生化学的、生理学的研究を実施している。

主要な研究テーマとその進捗状況

1. メチル水銀による中枢および末梢神経症状の発現機序ならびに治療法に関する基礎的研究。
2. 水銀による環境汚染、特に海洋細菌への影響に関する研究。
3. 生体試料中水銀の分析化学的研究。

メチル水銀中毒症状の発因としては中枢、末梢神経への影響が考えられている。1のテーマについて、本年度は胎児期にメチル水銀を曝露した仔獣の発達過程における行動科学的観察と神経伝達系、特に脳内活性アミン変化との関連について検討し、妊娠期間中、水銀曝露の時期が問題となることを示した。また水俣病研究の実験モデルとしての動物実験資料を得る目的から、メチル水銀中毒発現における動物の系統差、年齢差、性差について基礎的研究を行ったところ、これらいづれの因子も水銀の生体内分布、排泄等に影響を与えていたことが判明した。2のテーマについては水俣湾泥土中の細菌が、他の非汚染海域に比べ*Pseudomonas*属の占める割合が大であり、この細菌は水銀化合物に耐性を持っていることが明らかとなった。更にこの菌の耐性発現の機序についても実験を行った。水銀中毒の研究において3のテーマは最も基本かつ重要な課題の一つであるが、生体資料、魚貝類中の水銀を簡便かつ高い精度での分離、測定法の確立を試みた。以上の研究の詳細については各テーマ毎に、また水俣病に係る総合的研究班と当センター合同ワークショップの記事に後記した。

藤崎 正

妊娠とメチル水銀 一マウスをつかった実験的研究一

井上 稔 梶原裕二

胎児はメチル水銀に対して感受性が高いといわれており、しかも、実験的にではあるが、メチル水銀は母体の血中より胎児の血中の方に多いといわれる。妊娠している場合とそうでない場合で、摂取された水銀の挙動に違いがあるのか？胎児に移行した水銀はどのように動くのか？種々検討されてはいるが、まだ判らないことは多い。そこで本年は以下の実験をおこなった。

まず妊娠している場合とそうでない場合の比較をした。妊娠13日のマウスと、妊娠していない雌マウスに塩化メチル水銀を20mg/kg経口投与し、血液、脳、肝臓、腎臓に含まれる水銀量を、日を追って測定した。水銀量は水銀の化学形にとらわれず、臓器の湿重量あたりの総水銀量であらわした。妊娠していてもいなくても、血液（全血、血漿）に含まれる水銀量は投与1日後に最も多く、その後速やかに減少して、5日後には約半分になった。腎臓の水銀量も投与1日後に最も多く、5日後までに約3分の2に減少した。血液と腎臓では、いつも妊娠マウスの方が妊娠していないマウスより水銀量が少なかった。肝臓も最も多い水銀量がみだされたのは投与1日後であり、その時点では妊娠マウスと妊娠していないマウスでほとんど差がなかったが、その後、妊娠マウスの水銀量は速やかに減少し、5日後までに半分近くになったのに比べ、妊娠していないものでは減少の速度が遅かった。これらに相違して、脳の水銀量は、妊娠マウスと妊娠していないマウスの間にほとんど差がなく、ともに投与4日後までゆっくり増加し、その後ゆっくり減少しあげた。

この実験モデルでは、血液や内臓に含まれる水銀量は、妊娠している方が妊娠していないものより少ないが、脳の水銀量は妊娠していても、いなくてもあまり変わりがないという結果となった。妊娠期間のきわめて短いマウスをもちい、しかもメチル水銀は大量の一回投与で、観察期間も限られているので、微量の水銀に長期間曝された例をおし測ることは難しいが、もし類推が許されるなら、血中の水銀量の多い方がいずれ脳の水銀量も多くなるものとも思われる所以、さらに有効な実験モデル開発して検討したい。

いっぽう、前述の妊娠マウスでは、胎児の水銀量も測定して母体のそれと比較した。母体の肝臓水銀量は、既述のように投与1日後に最も多く、速やかに減少したが、胎児の肝臓中の水銀量は投与2日後の方が多い、その時点で母体の肝臓中とほぼ同じになった。その後は胎児の方が減少の速度がおそいので、5日後には胎児の肝臓の方が母体の肝臓より多くの水銀を含んでいた。

胎児と母体の比較で著しい相違がみられたのは、脳の水銀量であった。母体の脳ではゆっくりと増加し、4日後に最も多くなるのに反し、胎児では2日後にはほぼ最高値に達し、極めてゆるやかにしか減少しなかった。しかも、水銀量は母体の脳の2倍以上にもなった。

この実験モデルは、妊娠母体が大量のメチル水銀に曝された場合、母体の脳より胎児の脳の方がはるかに多い水銀を含む結果になることを示している。われわれが実際に出会うかも知れないような、長期にわたる微量のメチル水銀曝露が、はたして同様の結果をもたらすかどうか、さらに検討したいと考えている。

胎生期メチル水銀曝露マウスの行動および脳内アミン変化

村尾光治 井上 稔 藤崎 正

胎児性水俣病発生機序解明の一環として、胎仔期（妊娠14日あるいは17日）にメチル水銀曝露を受けたマウスの行動および脳内アミンの変動について検討した。実験動物には近交系C3H/HeNマウスを用い、妊娠14日目あるいは17日目に、塩化メチル水銀15mg/kgを経口投与した。産仔は母乳からの水銀再曝露を避けるために、出生24時間以内に無処置の里親につけて飼育した。生後2週令より8週令まで、週1回30分間Automexを用いて測定した自発運動量は、両投与群とも正常群に比べ有意に低く、行動上の発達に遅れがみられた。また、生後4週令と8週令に測定したオープンフィールド上におけるambulation（歩行）とrearing（立ち上がり）も有意に抑制され、特に妊娠14日投与群の方が著しかった。一方、高感度電気化学検出法により、生後8週令における脳内活性アミン含量を測定したところ、妊娠17日投与群では脳各部位とも正常群との間に有意な差は認められなかったが、妊娠14日投与群ではノルエピネフリンが大脳皮質で有意な減少、小脳および線条体で有意な増加、ドーパミンが橋・延髄分画で有意な増加、セロトニンおよびその代謝産物である5-ヒドロキシインドール酢酸が線条体を除く全分画で有意な減少を示した。以上のように、胎仔期のメチル水銀曝露により、マウスの行動および脳内活性アミン含量に変動がみられ、特に妊娠14日投与群で脳内アミンのうちセロトニン代謝が有意に減少していたことから、胎児性水俣病発生機序の一因としてセロトニンニューロン機能障害の関与が示唆された。

本研究に関する結果は、第37回日本薬理学会西南部会（昭和59年10月、鹿児島）において発表した。

メチル水銀の修飾因子に関する研究 —マウスにおけるメチル水銀の分布及び排泄の性差に関する研究—

平山紀美子 安武 章

一般に、毒物の作用を修飾する因子として宿主因子と外因子が考えられ、これらの因子、特に宿主因子を解明することは毒物の作用機構の解明さらには解毒、予防の方策を講じるうえにおいて重要である。外因子を検索するにあたっては、対照と外因子に曝露したものとの比較によって種々の情報を得るといったような方法が用いられるが、宿主因子の検索にあたっては動物の種類、系統、性別等によって生じる薬物や毒物の作用の相違等を利用する方法が考えられる。我々は、メチル水銀中毒の毒性修飾因子を解明するためにこれまで実験を行ってきたが、今回は宿主因子の検索のため、雌雄のマウスを用いてメチル水銀中毒における性差を水銀の分布、排泄について検討を行った。

純系マウス(C57BL/6N, BALB/cA)に塩化メチル水銀静注後5分、および24時間の水銀の分布および排泄における性差について調べると、水銀の排泄を無視しうる5分後では、両系とも腎臓の水銀量においてのみ雄が雌より高い値を示したが、他の臓器では差は認められなかった。一方、24時間後では、雄が雌に比し著しく尿中への水銀排泄が多く、その時点での臓器水銀量は、腎臓で雄が雌

より高い値を示したが、脳、肝臓、血液では尿中水銀の相違を反映して雄が雌より低い値であった。糞中水銀量に性差が認められなかつたことから、臓器水銀量の性差は尿中排泄の差によって生じ、尿への排泄は腎臓への水銀の取り込みと関連するであろうことが考察された。これらの臓器水銀量を経時的に追つてみると、投与後24時間では雄が雌より高い値を示した腎臓の水銀量も3日後では性差が消失し、5日後では雄が雌より低い値を示した。このことも上記の考察を支持する。

また、5日後の脳内水銀量が雄より雌が約2倍の高値を示したことは、中毒症状の発現時期にも性差が存在することを示唆している。さらに、水銀の分布、排泄における性差をC57BL/6N系マウスを用いて週令別に検討すると、幼若時には性差が認められず、性の成熟に従つて著明な性差が現れたことから性ホルモンとの密接な関係が明らかとなった。そこで、去勢およびホルモン投与の実験をおこなつたところ、テストステロンに尿中水銀排泄を促進する作用が、またエストラジオールには抑制する作用が認められ、双方のバランスによって尿中への水銀の排泄量が決まるであろうことが推測され、性ホルモンはメチル水銀中毒を修飾する宿主因子の一つであることが明らかになった。これらの性ホルモンと水銀の腎臓における取り込み、尿中排泄との接点がどこであるかを検討することは今後の課題であり、これらを解明することによってメチル水銀の動態についての詳細な知見を得ることが可能であると考える。

これらの結果の一部は第58回日本薬理学会総会（昭和60年3月、東京）において発表した。

メチル水銀投与マウスにおける水銀の尿中排泄および組織分布の系統差に関する研究

安武 章 平山紀美子

メチル水銀の毒性研究には種々の動物が用いられているが、最少毒性発現量、組織分布、生体内半減期、排泄の様式などは、動物種によって一様でない。また、同一種内においてもメチル水銀への感受性には微妙な差があり、我々は、ddY系マウスにおけるメチル水銀毒性への感受性の個体差が、尿中への排泄水銀量の差に起因することを認めた。そこで、遺伝的に純化された4系統の近交系マウス、C57BL/6N (B6)、BALB/cA (C)、C3H/HeN (C3)、AKR (AK)について、塩化メチル水銀 (5mg/kg) を経口投与後の糞尿中への排泄水銀量、および各組織（脳、肝、腎、全血、血漿）中水銀量の差を調べた。その結果、尿中排泄水銀量に関しては、B6系統のマウスが他の3系統に比べて著しく高い値を示し、その排泄速度は、一日当たり、体内水銀量の12.6%に達した。この値は他の3系統の4～5倍に相当する。一方、糞中への排泄速度はAKマウスがやや高い傾向を示したもの、どの系統も4～6%の範囲内で尿中への排泄程顕著な差は見られなかった。そこで、投与後5日間の糞尿中への総排泄水銀量を累積すると、B6系統では投与量の68%にも達したが、他の系統ではAK、38%; C, 32%; C3, 27%と低い値をとり、尿中排泄量の差が大きく影響していることがわかった。また、投与後1日から20日目の各組織水銀含量の変化は、いずれも指數関数的に減少し、どの組織においてもB6系統が最も急速な減少を示したが、特に、血中水銀濃度は、投与24時間後でもすでに他の系統の半分以下であった。このことは、B6系統マウスのヘモグロビン構造が他の3系統と異なり、そのためにメチル水銀との親和性が小さいという事実から説明できる。また、水銀濃度の血漿／全血比は濃度の変化に関わりなく、B6系統が常に高い値を

示し、血漿中における水銀の相対的分布の多いことが確かめられた。ここで、一旦血球中に取り込まれた水銀の流れを、血球→血漿→各組織（→尿中）と仮定すると、血漿中での相対的濃度の高いB6系統では、各組織への水銀の取り込みも速いと考えられる。ところが、静脈投与5分後の組織水銀量は、脳、血漿でB6系統が高い値を示したが、肝、全血では系統間に差が見られず、腎ではB6、AK両系統がほぼ同じ値で、他の2系統のマウスより高い水銀値を示した。以上から水銀の尿中排泄量における系統差は、腎への取り込みよりもむしろ血漿中濃度、即ち血球との親和性の寄与が大きく、組織への移行に関しては血漿中濃度だけでなく、水銀と各組織との親和性も関与しており、これらの親和性には各系統間で多少の差があると考えられる。

今後、メチル水銀毒性に対する抵抗性と排泄速度との関連性、および排泄時における水銀の分子形の解明について研究を進めていく予定である。

本研究の結果は第31回日本実験動物学会総会（昭和59年10月、東京）において発表した。

水銀による環境汚染、特に海洋細菌への影響についての研究

中村邦彦 藤崎 正

水銀による環境汚染は陸地、海洋、大気中全ての環境で進行しつつある。水銀に汚染された環境においては、そこに生棲する微生物、特に細菌が、水銀を細菌体内に高濃度に蓄積したり、毒性の強いメチル水銀あるいは揮発性の高い金属水銀に変換する反応を行ない、その結果生態系に影響を与えているものと考えられる。水俣湾は高濃度の水銀に汚染され、現在でもなお、その泥土中には高濃度の水銀が蓄積されている。

本年度は、水俣湾の泥土中の海洋細菌の水銀耐性を、細菌の種類ごとに、汚染の知られていない米之津および川内湾の細菌と比較して検討した。また、昨年、水俣湾より分離したシュードモナス属の11株について、これら細菌による揮発化反応についても、更に詳細に検討した。本年度実験した全ての泥土中では、水銀含量に関係なくほとんどがバチルス属の細菌であったが、水銀含量の高い泥土中では、シュードモナス属の細菌の割合が増えていた。塩化第二水銀の耐性菌（バチルス属、コリネバクテリウム属、シュードモナス属、ビブリオ属）は水銀濃度の高い泥土ほど、出現頻度も高くなっていた。水俣湾泥土より分離した水銀耐性シュードモナス属の11株の内10株は、塩化第二水銀、酢酸フェニール水銀を揮発し、1株はこれら水銀化合物の他に、塩化メチル水銀、塩化エチル水銀、塩化プロピル水銀をも揮発する能力をもっていた。これら細菌による塩化第二水銀の揮発化反応は、発育に最も適した発育至適温度および発育至適pH域で最も良く行なわれた。また、これらの細菌は、海洋細菌であるので塩化ナトリウム濃度と揮発化反応の関係を調べたところ、海洋と同じ塩化ナトリウム濃度で最も良く揮発化反応を行なうことを確認した。

本研究の詳細は、後記の合同ワークショップの項に記載した。また本研究の結果の一部は、第11回日本毒科学会学術年会（昭和59年7月、京都）で発表した。

ジチゾン抽出一ガスクロマトグラフィーによる微量メチル水銀の分析法とその環境試料への応用

赤木洋勝 菅野 淳

環境試料中のメチル水銀の定量には、試料を塩酸酸性下にベンゼン抽出し、抽出されたメチル水銀をシスティン水溶液に転溶後、水溶液を再び塩酸酸性下にベンゼン抽出してECD一ガスクロマトグラフィーにより測定する方法が一般に用いられている。この方法はとくに生物試料や生体試料を対象とした場合、ベンゼン抽出に際して堅固なエマルジョンを形成し、操作が繁雑になるばかりでなく、メチル水銀の抽出効率が試料により変動することがしばしば指摘されており、これらの難点を改善すべく、従来よりパパイン分解法、アルカリ処理法、水蒸気蒸留法などの前処理法が考案されている。一方、我々はモデル水銀における水銀の化学形変換および分布に関する研究の一環として、放射性水銀を用いて化学形態別に水銀量を評価する手法を検討し、低質、生物、浮遊物質などの固体試料については、試料を水酸化カリウムのエタノール溶液で処理後弱酸性下にジチゾンのベンゼン溶液で抽出し、水銀のジチゾネートの形で薄層クロマトグラフィーにより分離定量する方法をすでに報告した。ジチゾンは従来より水銀の比色定量法として繁用されてきたキレート剤であり、これを用いた抽出法は単なるベンゼン抽出法に比べて抽出効率が高く、少量のジチゾン—ベンゼンで充分抽出できる利点がある。また、ジチゾンと水銀イオンとのキレートは比較的安定で酸、アルカリによる洗浄が可能であり、抽出後の操作が容易であることも大きな利点である。さらに、メチル水銀のジチゾネートは通常のガスクロマトグラフィーによるメチル水銀の分析条件下に注入と同時に熱分解を受け、カラム中のクロリドイオンと結合して塩化メチル水銀の形で検出されることが確認されたことから、今回とくに、生物試料を対象とし、それらに含まれるメチル水銀を簡便にかつ高精度に定量しうる手法を開発すべく、試料の前処理法、ジチゾンを用いたメチル水銀の抽出条件、抽出後のクリーンアップ、試料溶液の濃縮法などに主眼をおいて検討した。その結果、試料の水酸化カリウム—エタノール処理による蛋白分解、さらに中和後n—ヘキサンによる脂肪分除去を行なうことにより、エマルジョン形成もなく、少量のジチゾン—ベンゼンで効率よくメチル水銀が抽出されること、また抽出されたメチル水銀のクリーンアップ法としてはアルカリ性硫化ナトリウム溶液による逆抽出が最適であり、抽出されたメチル水銀は微酸性下に窒素を吹き込んで溶液中から過剰の硫化物イオンを除去することにより、再びジチゾン—ベンゼンで抽出され、ガスクロマトグラム上に妨害ピークのない試験溶液を得ることができた。本法の魚肉についての添加回収実験 ($50\text{--}200\text{ ng/g Tissue}$) では95—103%の高率を示し、また市販魚肉について本法の5回の繰返し分析結果は 0.190 ± 0.0085 で精度も高く、本法を用いておおむね 0.005 ppm (試料 1 g) まで測定可能である。なお、本研究の一部は第11回環境汚染物質とそのトキンコロジーシンポジウム（昭和59年10月、札幌）において発表した。

3. 疫学研究部

研究の概況

有機水銀による環境汚染と、それに起因する地域住民の健康被害の実態を究明することを目的として、種々の疫学資料の収集・整備・解析を行っている。

主要な研究テーマとその進捗状況

1. 水俣病認定患者等の疫学的特性に関する研究
2. 水銀汚染地域住民の死因等に関する疫学調査研究
3. 水銀濃厚汚染地域住民の追跡調査研究

現在のところ利用可能な資料は死亡と出生に関するものだけである。死亡に関しては、水銀汚染地域と対照地域、あるいは水俣病認定患者と対照者について、いくつかの方法で比較した。しかし、いくつか微妙な点で方法の違いが分析結果に反映し、確たる結論を得るに至っていない。また、出生に関して水銀汚染地域と対照地域の比較を試みたが、利用可能な資料からは有意差を認めるに至らなかった。

柴田 義貞

水俣病研究センターにおけるコンピューター・システム

鈴木猛郎

疫学、臨床および基礎研究の効率化のために、コンピューター・システムが導入されて本年度末で2年6月を経過した。現在のシステムの機器構成は、中央処理装置（4Mバイト）、コンソール（1台）、磁気テープ装置（3台）、磁気ディスク装置（4台）、X-Yプロッター（1台）、端末器（7台）、日本語ラインプリンター（1台）である。この構成は、疫学調査の統計処理、文献資料の検索、臨床資料の解析、基礎実験データの統計解析というように、文字情報を取り扱うことを主眼にしたものである。この文字情報をコンピューターシステムで取り扱うには、いったん人間が、情報を得て加工してから人力するという2次的な方法を取らざるを得ない。実験データに例をあげれば、測定器が計出する波形データを読み解し、数値化して入力することになる。文字情報は、コンピューター内では、「0」と「1」の信号となって、処理手順（プログラム）に従って形を変えて行き最終的には、結果表、図形等として表現される。今までのコンピューターの利用形態は、この文字情報処理が大半であった。

しかし、最近のコンピューターの利用方法は原始データを直接入力するものである。比較的早くからこの方向にあったのは、波形データを取り扱う分野で、心電図の解析、脳波の解析という臨床医学、地震学等の地球物理学等である。さらに、大容量の記憶素子が大量生産されるようになってからは、人間の目に写る像そのままを、コンピューターに取り入れる技術が開発されてきた。これに利用されるのは、よく言われる「マイクロ・コンピューター」である。このコンピュ

ーターの利点は、大容量の記憶素子を有しながら価格が安いこと、周辺機器が小型であること、などがある。また、マイクロ・コンピューターが広く普及している理由の1つに「人間の目に写る像そのまま」の定義が、コンピューターを利用する「人間の個人差」で非常に大きく異なり、個人ごとに必要となるからである。マイクロ・コンピューターによる処理は小さい像で加工手順が少ないと十分に間に合うが、大きい像で加工手順が複雑になると処理時間が長くなり十分に満足できる結果が得られない。今後の国立水俣病研究センターにおけるコンピューター・システムは、この点を十分に考慮した機器構成にすることが肝要である。

3. 所内セミナー記録

(1) Nondestructive X-ray Fluorescence Spectrometry for Determination of Trace Elements along a Single Strand of Hair

T. Y. Toribara

University of Rochester School of Medicine
and Dentistry, Rochester, N.Y., U.S.A.

Concentrations of trace elements in hair are finding increasing value in nutritional studies (essential trace elements) and in toxicology (toxic metals). Previously available methods have been tedious, time-consuming, and expensive. We describe here a new development in X-ray fluorescence instrumentation that provides automatic longitudinal scanning for some 16 elements in consecutive hair segments. The mass (in $\mu\text{g}/\text{mm}$) is determined simultaneously at each point, and the absolute concentrations are computed in parts per million for the elements. The method is nondestructive, and results (including mass) show much reproducible detail. The millimeter by millimeter longitudinal analysis allows recapitulation for previous toxic metal exposures for months or years, depending upon the length of the hair strand. This instrument, in a clinical setting, opens up many new research opportunities.

(2) Results of Computer Analysis of the Costal Water of Lake Balaton

Béla S. Ralovich

Institute of Public Health and Epidemiology,
University Medical School, Pécs, Hungary

Balaton is the largest lake in Middle Europe (length: 72 km; surface: 588 km^2 ; wideness: 3-5 km; average depth: 3.3 m; catchment area: 5774 km^2 ; volume of the water: $1.9 \times 10^9 \text{ m}^3$). It is a very popular place not only for Hungarian but also for foreign visitors. Last year during five months (May, June, July, August and September) about 10 million persons stayed at the lake for shorter or longer period of time. During last 15 years some changes of the quality of the water have been observed. To verify the most important relationships we have regularly controlled more than 40 parameters of the water. Samples are taken at four places of the lake. Seventeen parameters (living germ count at 20°C and 37°C, number of coliforms, number of sulfite reducing bacteria, temperature, COD, 5-day BOD, NH_4^+ , NO_3^- , reactive PO_4^{3-} , total dissolved inorganic substances, HCO_3^- , dissolved O_2 , pH, total nitrogen, total phosphorus, chlorophyll-a) out of the all are studied in this work.

We used 1037 data of 61 samples for the analysis. Multiple linear correlation and regression analysis, one-way variance analysis and factor analysis were performed on the basis of BMD computer program. The significant coefficients of the correlation matrix may allow the conclusion that the individual parameters are in multiple relationship with each other. The variance analysis proves that chemical, biological and bacteriological differences are present along the longitudinal axis. On the basis of the results of factor analysis six factors - phytoplankton system, anthropogenic effect, own bacterial system, nitrogen circulation, hydrocarbonate and reactive phosphate system and NH_4^+ circulation - could be separated.

(3) メチル水銀の内分泌影響について

長崎大学医学部公衆衛生学教室 奥 真徳

メチル水銀の内分泌影響と題して、マウスのメチル水銀（塩化メチル水銀）投与後の、1)副腎ステロイド（コルチコステロン、BK）合成、および2)大脳、小脳、心、副腎各臓器中カテコールアミンの変動に関する実験データを紹介、概説した。

血中BKは、投与後30分あるいは1時間に約2～3倍に増加する。妊娠マウスでは、BKの基礎分泌が高まっているが、同様にその2～3倍に増加し、とくに高感受性個体では、それ自体でも口蓋裂を誘起するレベルにまで急増するものがみられた。

臓器中カテコールアミンでは、大脳、心には明らかな変動を認めなかつたが、小脳のノルエピネフリンは52時間後に有意增加、また、副腎のノルエピネフリンと、とくにエピネフリンは25時間後に有意に増加した。

血中BKの増加は、Changらの報告でも明らかなように、メチル水銀による口蓋裂発生を説明しうるものではないが、同様の急性期における肝タンパク合成（メタロチオネインを含む？）刺激状態のメカニズムとして作用しているものと考えられる。また、BKの増加による副腎髓質の酵素PNMTの活性上昇が知られており、副腎エピネフリンの増加の一部はBKの増加を反映したものと推定される。

血中BKの増加が、メチル水銀の中枢作用を介するかどうかについて、現在ACTH、プロラクチン、TSH等の変動に関する実験を実施中であるが、こうした内分泌影響と行動・神経系への影響との関連性を総合的に把握するためにも種々神経ペプチドを含む、神経内分泌学的な検討がさらに必要と考えられる。

(4) ヒ素の代謝について

鹿児島大学工学部応用化学科 前 田 滋

自然環境における陸上の生物体に含まれるヒ素の濃度はおむね数10～数100ppbであるが、一方海産食品のヒ素濃度は数ppmから数10ppmであり、100ppmを越えることも珍しくない。海水のヒ素濃度は1～8 ppbであるから、これら海産生物は海水よりも 10^3 ～ 10^5 倍高い濃度でヒ素を蓄積していることになる。無機のヒ素、とりわけ三価の無機ヒ素は猛毒であり、ヒトに対する最低致死量は $0.4\text{mg}/\text{kg}$ といわれている。若し海産食品中のヒ素が三価の無機ヒ素であるとすると、体重50kgのヒトが、たとえばヒ素50ppmを含むカニを400g摂取すると、ヒ素が20mg投与されたことになり、最低致死量を越えているので死に至る可能性が大きいはずであるが、過去においてカニなどの海産物を摂取してヒ素中毒で死んだヒトはいないのである。このことは海産食品中に含まれるヒ素は三価の無機ヒ素に比べて極めて毒性が小さい化学形態であることを意味する。

最近の研究によると、海産生物中のヒ素化合物は、たとえば次式に示されるように高度にメチル化された有機ヒ素化合物であり、これをヒトを含む高等動物に投与すると何ら生体内反応をすることなく、また何ら酵素阻害作用なしに速やかに体外に排泄されることが解明されてきた。

$$\text{CH}_3 - \overset{\text{CH}_3}{\underset{\text{CH}_3}{\text{As}}} - \text{CH}_2\text{COO}^- \quad (\text{アルセノベタイン})$$

ヒ素の生体濃縮と有機化は、海の生態系における食物連鎖において、栄養段階的に遂次進行するのではなく、低次の栄養段階（プランクトン等）で、既に高度のヒ素蓄積と有機化が行われており、これがそのまま順次高次栄養段階生物へ移行すること等も明らかになってきた。

ヒ素のこのような性質は、水銀の生体濃縮・毒性と相反するものがあり大変興味深い。

(5) 外因性脳発生障害の発現要因

名古屋大学環境医学研究所 龜 山 義 郎

環境要因による実験的脳発生異常のうち、形態形成過程をヒトと対比させうる奇形として、①器官発生の障害に基づく外脳、holoprosencephaly、②組織発生過程における細胞の増生、遊走の障害に基づく小頭、奇形性水頭、脳梁欠損、灰白質異所形成、皮質構築異常、③その後の発育過程に起こる実質的破壊性病変、水頭が挙げられる。

脳発生異常の初発変化と終局的な形態異常を結ぶプロセスには、神経・間葉誘導障害、組織損傷の修復異常、退行性変性、血行障害、出血、髄液の产生・吸収動態の異常などが相互に原因となり結果となり、それらが連鎖反応の帰結として終局的な奇形がもたらされる。したがって、器官発生の障害による奇形では、同一の初発変化がその程度とひろがりの違いによって一見別個と思われる奇形の様相を示す場合がある。また組織発生の障害による奇形では、二次的に破壊性病変が起こりやすく、これがしばしば初発変化である組織発生障害の像を隠蔽する。実験的組織発生異常の遅発性二次変化、とくに血行障害性変化とその帰結は、ヒト周生期脳障害の一次的原因を胎生早期までさかのぼって追求する必要性を教える。

環境要因による脳発生異常は新生児に奇形の形で顕在化せず、遅発性に機能障害を現わす場合が少なくない。これまで見逃されてきた微細あるいは潜在性脳発生異常を効果的に検出できる実験システムの確立は現在の神経奇形学の重要課題の一つである。これまでこの方面的研究として、低線量X線による微細な大脑発生異常の形態学的検索があり、今後の発展が期待されるものとして実験行動奇形学的研究がある。

(6) 脳損傷児に対する神経発達学的評価と治療(アプローチ)について

宮城県整肢拓桃園 鈴木 恒彦

脳に損傷が生じた結果生ずる症状として、従来から神経症候学では陰性徵候と陽性徵候の発現(by Jackson)がよく知られている。すなわち随意運動が失われた状態(陰性)と筋緊張の亢進やバビンスキ一徵候の出現(陽性)の二つの要素の存在についてである。しかし脳の機能が成熟した後に起る成人の脳卒中はともかくとして、脳が未熟で、随意運動を構築するシナプスの形成がまだ準備状態の周産期を中心とした時期に脳損傷が生じた場合、この二つの要素は多分にその形を変えてくる。例えば脳性麻痺児の示す種々の正常運動発達の遅れ(頸定、坐位、歩行、発語等の遅れ)と病的運動パターンの発達(正常児の発達の中では見られない股位や運動)に代表されるように、それは正常発達の遅滞又は停止と異常発達による病的パターンの形成というように経時的に症状が変化する要素を含んでいる。この場合重大なことは、原因がどうあれ、脳損傷が新生児期又はそれ以前に起った場合、その後の多面的発達の中で正常児が通常経験できるような運動一感覚系の学習ができなくなり、異常な神経回路網が形成され、常に異常パターンに基いた感覚系からの入力により病的パターンの学習が進んでしまうことが推測される。このことは臨床的には、病状が悪化する(乳児期には不明確なもの年長になるにつれ随意運動の選択の幅が拡大せず、痙攣や不随意運動の存在がしだいに明らかになってくること)と一致する。このような神経生理学的考え方の前提に立って、脳損傷児を診断、評価し、治療を系統だてるためには、正常児の示す発達の質について従来から強調されているような姿勢反射の発達や運動発達指標の段階的追跡といったものだけではなく、その多面的発達経過の中で原始的運動パターンから協調的運動パターンへの形成とその構成要素についてより神経発達学的に詳細な検討が必要となる。

(7) 環境汚染物質特に多環芳香族炭化水素の毒性と動態について

国立公衆衛生院 松下秀鶴

癌制圧は我が国を含む先進主要国における保健上の最重要課題の一つである。人癌の70~80%は環境発癌因子にもとづくとされている。したがって、環境中にはどの様な種類の発癌因子がどの程度存在し、日常生活を通じてどの程度摂取しているかを定量的に把握し、これにもとづいて適切な対策をたてることは癌対策の一環として極めて重要である。

多環芳香族炭化水素系発癌物質は、ニトロソアミン、マイコトキシン、有機ハロゲン系化合物

と共に、環境中の発癌物質として極めて重要な地位を占めている。これは、a) 多環芳香族炭化水素は物質の不完全燃焼等により発生すること、b) 現代社会は大量のエネルギー消費、すなわち、大量の化石燃料の消費により成立しており、しかも燃焼行為は社会のあらゆる場所で、日常的になされていること、c) コールタールなど、多環芳香族炭化水素を比較的多量含む工業材料に暴露された労働者から職業性皮膚癌や肺癌の発生が認められていること、d) 多環芳香族炭化水素は種々の環境試料から、微量ながら検出されていること、およびe) 非発癌性又は非変異原性の多環芳香族炭化水素でも空気中などの化学反応により発癌性又は変異原性物質に変換されうることが明らかとされつつあることなどによる。また、多環芳香族炭化水素の発癌性は共存物質等の影響を大きくうけることも知られている。

そこで本セミナーにおいては、まず、何故癌が社会的に大きな関心をあつめているのかその理由についてのべたのち、多環芳香族炭化水素の発癌性に及ぼす第3物質の影響 (promotor, co-carcinogen, inhibitor 等) や発癌作用の特徴などをのべ、環境中の多環芳香族炭化水素の分析方法とその環境分布を空気の場合を中心にのべた。そして、特に空気中の多環芳香族炭化水素の生体影響を論ずる場合、室内中の存在量を正確に把握する必要があることを日本人の生活行動様式や室内での存在量などをもとに強調した。また、喫煙に伴う室内汚染や喫煙モードによる多環芳香族炭化水素吸入量の変化にも言及した。

(8) 水銀化合物の微生物転換

大阪府立大学農学部農芸化学科 外 村 健 三

演者は昭和40年より水銀化合物の微生物転換について研究してきたので、この研究をとりまとめて述べる。

昭和40年当時はイモチ病防除のためにフェニル酢酸水銀 (PMA) を水田に散布していた。水銀化合物は一般に生物に対し毒性をもっているため、散布された水銀化合物の運命を知ることは重要なことであった。当時、水銀化合物を微生物が分解するという考え方は演者にもなかったので、PMAの生産工場の土壤中より分離したPMAに耐性な *Pseudomonas K62* の水銀耐性機構から研究を始めた。その結果、有機水銀の分解酵素と水銀イオンの還元酵素を分離し、その性質を明らかにして、有機水銀の分解機構を初めて提案した。次に、水銀をメチル化する *Clostridium cochlearium* を土壤中より分離し、メチル水銀の生成機構を研究して、メチルコバラミンが水銀のメチル化に関係することを明らかにした。活性スラッジ中の水銀化合物の変化、およびメタン醸酵中の水銀化合物の変化についても検討し、好気的および嫌気的環境下における水銀化合物の微生物変化をまとめて、水銀サイクルを提案した。最後に、水銀耐性を担うプラスミド *puol* を土壤細菌より分離し、これを遺伝子解析した結果、*puol* 上にフロロ酢酸およびクロロ酢酸をそれぞれ脱ハロゲン化する酵素を支配する遺伝子が存在することを明らかにした最近の研究の結果について述べる。また、プラスミドを利用した環境浄化菌の分子育種についてもふれる。

(9) 医学における教訓的なデータ解析の例

名古屋大学工学部 吉 村 功

データを用いての議論は客観的で確かなもの、と思われがちだが、実際はそうではなく、不適切なデータの取扱いのために、誤った結論を導びいていることが少なくない。そのような誤りを減らすには、それぞれの分野における実例を検討し、そこから教訓を学ぶのがよい。

本講演では、医学における教訓的な例として“薬C”によって“A”が生じるというCA仮説についての論文を題材とする。

第1例は、グラフで錯覚を起したもので、非特異性疾患についての因果関係は、対数グラフ上で、一見関連がないように見えるというのが教訓である。

第2例は、条件の差を無視して、外国のある年の数値を、日本のすべての年にあてはめたために結論を誤ったもので、モデルの数学的定式化を怠ると勘ちがいを生じやすいというのが教訓である。

第3例は、サンプリングの抜取率と母集団の大きさを考えにいれなかったもので、分類表形式のデータでは、母集団とサンプリング法を吟味すべし、というのが教訓である。

第4例は、死亡率の分母をとり違えて誤った結論を出したもので、比率を用いる場合は、分母分子の物理的意味を確認すべきというのが教訓である。

第5例は、患者の発生数だけで量反応関係を否定しようとした誤解で、量反応関係の認識は、発生率によらなければならないというのが教訓である。

第6例は、重回帰式の係数についてよくある誤解を数値例で示したもので、独立変数の間に大きな相関がある場合には、教訓としては、回帰係数に意味づけをしてはいけない、ということが言える。

以上が本講演の要旨である。

(10) 始原生殖細胞の発生 —有羊膜類を中心に—

熊本大学医学部解剖学第3講座 藤 本 十 四 秋

生殖細胞（卵や精子）は発生初期から、生殖巣の中に存在していたものではなくて、生殖巣とは全く別なところから発し、移住てきて分化を遂げたものなのである。このような生殖巣外から移住してくる生殖細胞の元になる細胞を始原生殖細胞 primordial germ cells (PGCs) と呼んでいる。ヒトでは3～4週胚で、卵黄嚢内胚葉の中に見つかる。PGCsはそれから胚の後腸上皮に移り、そこを離脱して背側腸間膜に至り、その組織内を通して生殖巣原基に移住していく（移住完了は6週胚）。ニワトリ（鳥類）では PGCs は、やはりはじめ内胚葉の中に宿っているが、そこを出ると、形成中の血管系に入り、一時期、血行によって移動する（孵卵2日胚）。それからまた血管を離出し、背側腸間膜を経て、最終目的地の生殖巣原基に移住していく（孵卵3.5日胚）。

ところで、PGCsが迷わず胚内の生殖巣原基に移住していくのは、どのような機構によっているのであろうか。それについては、① in vitro の動態観察からも、PGC自身のアメーバ様

自動運動によっていること、②また、移動の道すじにおける細胞外マトリックス・糖蛋白・fibronectinが、有意な役割を果していること、③そして生殖巣原基にPGCsを誘引する、ある力があること、(in vitroの実験)、が確かめられた。PGCsの起源(発生過程のいつ、どのようにして体細胞系から分離してくるのか)については、有羊膜類(爬虫類以上の脊椎動物)ではまだ殆んど解明が進んでいない。しかし、無尾両生類や無脊椎動物のあるものでは、発生の極く早い時期(卵割期)に遡ってPGCsを追求できるものがある。これらについても解説を加えた。

(11) 「John Graunt の生命表から現代医学研究における生存分析法まで」

University of Texas School of Public Health, Houston, Texas, U.S.A.

季 殿 島

歴史的にみると統計的方法は既存のdataを使ってそれぞれの時代における個別の問題を解決するように意図された。すべての方法論が現実の問題を解決できたわけでないが、それぞれの試みは科学的な方法論に積み重ねられていった。John Graunt (1620~1674) の研究はこのことを示す非常によい例である。彼は出生と死亡の記録をていねいに分析すると有効な情報になり得ることを明らかにした。彼は「政府関連事業の数量化作業・政治的な算術を正当化する技術」を主張している、友人のWilliam Petty (1623~1687) から影響を受けた。この政治的算術の主眼は国民生活の基本的なdataを数量化に確立することであり、彼はこのような知識が国家の富強を増加させるのに役立と信じていた。Grauntがロンドンにどのくらいの戦闘要員がいるかという現実的な問題に答えを出そうとした背景には以上のことと関連していた。まず最初にロンドンの人口を推計しようとした。即ち、彼の答えは基本的に一定期間中にそのために洗礼者、死者、100ヤード四方にいる家族数の3つの異なった方法を用いて推計した。そして彼は数学的理論を利用してこの推計人口の年齢分布を導いたが、これが生命表の初步的 form を作るきっかけとなった。このTableから彼は死亡率が長期間中に変わらないとの仮定のもとにロンドンの人口のうち34%が戦闘要員(男)(16才での生存者数 - 56才での生存者数)であると推定した。実際には彼は生存者の代りにこの年齢階級における人口割合を生存者ではなく死者から推定した。このようなはっきりした誤りにもかかわらず、彼の数表は現代生命表を発展させる基礎になっていた。

生命表の方法論的要素は1693年に初めて生命表を発表し、「生命の確率」という新語を使った天文学者のEdmund Halley (1656~1742) によって受けつがれていった。この表は年金の計算を可能にし、また Halley の数表を使って18世紀にロンドンに生命保険会社が最初に設立されたことは非常に意義がある。18世紀も進むと、保険業が保険統計を刺激したことにより生命表の作成方法も改善されていった。さらに感染症対策における、いわゆる公衆衛生の運動の絶大な効果に関心をもった人々によって育成された。また生命表の方法論に特別に寄与した人は1760年のDaniel Bernoulli (1700~1782) である。彼は天然痘による死亡を分析し予防法としてのVaccinationの利点を示した。特に死因としての天然痘がなくなるとある何年生存年数が増加するかの方法を示した。これは複合(Multiple-decrement)生命表および競合危険度分析(Competing

risk analysis)の起源である。約100年後に、Makeham が完全な複合死力 (Multiple decremental force) の理論を発表し、競合危険度に関する問題を扱う保険統計業務に理論的な基礎を提供した。Benoulli は母数によらない方法を使いたが Makeham は Gompertz の初期の研究を拡張し、多くの経験的生命表に適用された Gompertz-Makeham の死亡法則として知られる重要な母数モデルを紹介した。

生命表による方法は確かにある治療を受ける患者の生存率を推定するため医学の追跡研究に多く使われてきた。しかし追跡研究で得られた data は複雑であり一般的な統計手法で分析を行うことには向いてない。このような研究では患者をいろいろな時期に集めなければならないし、また完全な生存の情報が収集される前に終らなければならない。したがってこのような data は研究のはじめとおわりにおいていずれも不完全である。生命表はとくにこのような type の data に適当である。簡単にいえば、この方法は患者の生存がある病気と診断された出発時点から一定期間まで観察され、生存 data は観察が行なわれた暦の時間とは無関係に観察開始時点からの期間により計算することを前提としている。

追跡法による生命表を作成する通常の方法は前に説明した生命表のものと同じである。追跡生命表で最終に得たものは各期間での累積生存率である。生存率の標準誤差を計算する方法は1926年に癌の自然持続期間に関する報告を書いた Greenwood によりもらされた。文献には生命表の手法を使った多くの医学的追跡研究が紹介されている。生命表手法は統計的理論における耐久性と信頼性とがそなわった時にその意味を持っている。生命表手法では生存期間は生存間隔としてまとめられるのに対し確率手法では個々の生存期間がとり扱われる。統計的には生存期間の分布は生存函数、密度（死亡確率）函数、ハザード（条件付死亡）函数の3つの函数である。この3つの函数は数学的に相互に関連している。これら3つの函数が定義され推定された時にはそれぞれの集団の生存模型は比較可能であり統計的有意性を検定することができる。Kaplan と Meier は1958年に生存函数を推定する Product-limit 方法を紹介した。これは推定の一般的な方法である。しかし、標本数が非常に多い場合はこの方法は生命表手法と同じ結果を得る。1969年に Gehan は生命表からこれらの3つの統計的函数を推定する方法を紹介した。また生存分析に対する統計的検定の方法も生命表分析に適用することができる。生命表手法は医学および疫学的研究における重要な手段であり、多くの複雑な統計的問題に答えるために利用されている。今回の歴史的概説がまだこの方法を使用したことのない人を納得させ、またすでに使用している人にはさらに理解を深めたものと期待している。

(12) Statistical Analysis of Survival Data

Kenneth J. Kopecky

Radiation Effects Research Foundation
Hiroshima

Survival data is characterized by the facts that (i) survival times are positive random variables, and (ii) such data are frequently subject to censorship, i.e., some observations may be incomplete due to end of study, loss to followup, etc. In this presentation we review how standard approaches to statistical analysis, modified to account for censoring, have been applied to the analysis of survival data. Although a variety of ways to describe survival distributions are available - the survival function, median survival time, five-year survival probability, etc. - the hazard function is an especially useful representation for models of survival. For parametric statistical analysis, the hazard function is assumed to be in a specified family of functions, indexed by one or more parameters. The optimal methods for testing and/or estimating the parameter values depend on the family specified. For nonparametric analyses, such as those based on Cox's proportional hazards model, no restrictions are placed on the shape of the hazard function; instead, for comparative studies, inference is directed to the relationships between hazard functions. A third general approach, semiparametric analysis, has been developed in recent years. In this approach, no restrictions are placed on the hazard functions, which are estimated simultaneously with inferences about relationships between hazard functions. This approach is especially useful for large data sets and grouped survival data, and can provide useful descriptions of relationships between survival distributions and other covariates. The themes of this talk are illustrated by examples, including data from a randomized trial of chemotherapy for leukemia, and data concerning leukemia incidence among A-bomb survivors.

4. 合同ワークショップ記録

第1回

水俣病に関する総合的研究班・国立水俣病研究センター

合同ワークショップ

テーマ 水銀の動態および毒性

日 時 昭和59年11月16日(金) 9:00~17:15

場 所 国立水俣病研究センター 3階会議室

1. 水銀による環境汚染、特に海洋微生物への影響について-----中村 邦彦(国水研)
2. 微生物の水銀耐生獲得機構と水銀のメチル化・脱メチル化反応-----井村 伸正(北里大)
3. 水圈における水銀の動態に関する研究-----赤木 洋勝(国水研)
4. メチル水銀の生体内動態に関する研究-----平山紀美子(国水研)
5. 妊娠中に母体を通じて有機水銀に曝露されたマウスの生後観察-----井上 稔(国水研)
6. 無機水銀直接定量法とラット胎仔、新生仔におけるメチル水銀
無機化反応の欠如-----小西 鉄朗(熊本市
保衛研)
7. 動物体体内でのメチル水銀 Biotransformation の抑制と促進-----須田 郁夫(熊本大)
8. メチル水銀の血中、胆汁中の動態とセレンによる生体内動態
の修飾-----永沼 章(北里大)
9. 脳神経系における酵素及び蛋白合成系に対するメチル水銀毒性-----小俣 三郎(新潟大)
10. 培養神経系細胞でのメチル水銀毒性の研究-----三浦 郷子(和光大)
11. 水銀中毒動物の行動と脳内アミン-----藤崎 正(国水研)

1. 水銀による環境汚染、特に海洋微生物への影響について

国立水俣病研究センター基礎研究部生理室
中村 邦彦

微生物は各種重金属化合物との相互作用により生物環境変化に少なからず影響を与えていいると考えられる。特にこれまで広範な環境汚染が報告されている水銀については環境微生物との関連で多くの研究がなされてきた。水銀汚染環境下における水銀耐性菌の出現、さらにはこれ等菌による水銀化合物の形状変化は環境中の水銀の循環、生物への影響を変化させる可能性があるため多くの注目を集めている。とりわけ細菌による水銀形状の転換中揮発性 Hg^0 への変移は底質から大気中への拡散、底質中からの消失の意味から興味が持たれる。水俣湾は工場が排出した高濃度の水銀で汚染され、水俣病の原因となったが、現在でもその泥土には多量の水銀が含まれている。このような水銀汚染環境下での微生物—水銀間の相互反応、特に水銀の循環に対する水銀耐性菌の関与を検討するため本研究を行った。

実験方法

実験に供試した水銀汚染泥土は、1982年6月及び1984年6月水俣湾より採取した。又一方対照泥土として同時期の湯之鬼、米之津及び川内湾の泥土を採取し試料とした(Fig. 1)。基礎培地には人工海水を含むZoBell 2216 E培地を用いた。分離菌株の分類は、Shewanの分類¹⁾およびBergyの細菌分類マニアルに従った。最小発育阻止濃度(MIC)は25°C、24時間及び48時間振とう培養後、660 nmの比濁度から決定した。水銀耐性菌による水銀の揮発化は、 $HgCl_2$ 添加培地からの水銀の減少量から換算するとともに揮発した水銀は0.25%過マンガン酸カリウムで補集後、フレームレス原子吸光光度計を用いて測定した。

実験結果

水俣湾、米之津および川内湾泥土中の細菌相を

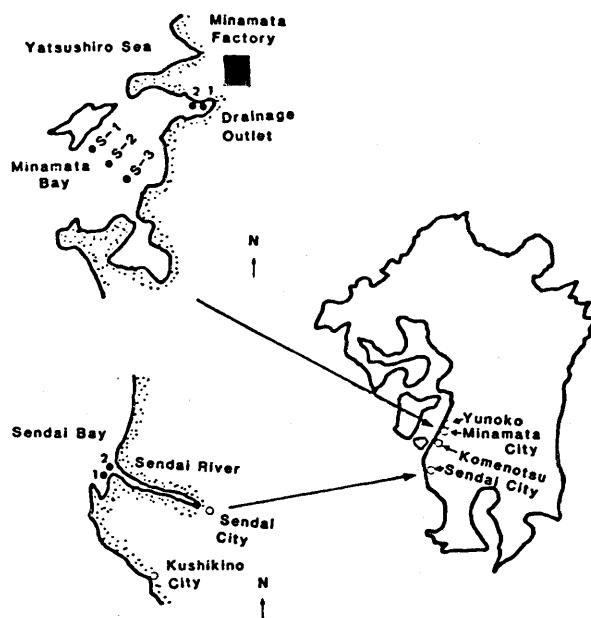


Fig.1 Sampling station

表1に示した。泥土中の総水銀濃度は0.1 $\mu g/g$ から45.8 $\mu g/g$ の範囲であり、総菌数は、 5.1×10^3 から 7.1×10^4 の範囲であった。この点で、泥土中の総菌数と総水銀濃度には相関が認められなかった。供試した全泥土中でBacillus属が優勢を占め、総菌数に対する割合は38%から80%であった。Pseudomonasの総菌数に対する割合は、泥土中の水銀量に比例して上がる傾向が認められた。水俣湾、湯之鬼および川内湾の泥土中の総菌数に対する水銀耐性菌の割合を表2に示した。泥土中の水銀値が高い地点の試料ほど水銀耐性菌の割合は大きかった。すなわち、水俣湾および川内湾泥土中の総菌数はほぼ同一であったが、これに対する水銀耐性菌の占める割合は100倍以上の差が認められた。 $40 \mu g/m^3 HgCl_2$ 添加寒天培地で発育して来た菌は全てPseudomonas属であった。また

Table 1 Microflora in Minamata Bay sediment

		Minamata Bay				Sendai Bay		Kommo-stu
		M-1	S-1	S-2	S-3	SE-1	SE-2	
Total Hg (ug/g)		45.8	23.0	30.3	28.7	1.0	0.2	0.1
pH	-		7.7	7.6	7.7	-	7.6	7.6
Temp (°C)	-		22.3	22.5	23.1	-	29.6	29.4
COD	-		2.2	3.5	3.7	-	6.4	8.6
CFU (/g)		7.1×10^4	1.6×10^4	5.1×10^3	5.6×10^3	5.9×10^4	7.5×10^4	1.5×10^4
Microflora	Bacillus	54 %	57 %	42 %	43 %	57 %	38 %	80 %
	Pseudomonas	23	6	7	20	9	1	2
	Vibrio	1	7	21	5	9	31	5
	Corynebacterium	11	9	7	9	5	5	5
	Other							
	Gram -	7	16	17	11	15	15	4
	Gram +	5	5	6	11	5	10	4
		147(100%)	203(100%)	222(100%)	202(100%)	82(100%)	182(100%)	190(100%)

Table 2 Percentages of Hg-resistant bacteria

	Mercury conc.	CFU/g	Concentration of HgCl ₂ (μg/ml)			
			2	10	20	40
Minamata Bay (1)	45.8 μg/g	7.1×10^4	100 %	100 %	58 %	38 %
Minamata Bay (2)	27.4	1.1×10^4	86	39	20	8.6
Yunoko		3.3×10^4	100	79	6.4	0.8
Sendai Bay (1)	1.0	5.9×10^4	78	69	6.1	0.3
Sendai Bay (2)	1.0	9.5×10^4	100	96	11	0.3

水俣湾、米之津および川内湾の泥土中の *Bacillus* 属、*Pseudomonas* 属、*Vibrio* 属、*Corynebacterium* 属の HgCl₂ および CH₃HgCl 对する属内の耐性度を比較したところ、耐性の高い菌の出現は、泥土中の総水銀濃度に比例して増大していた。水俣湾由来の 40 μg/ml HgCl₂ 添加寒天培地で発育してくる *Pseudomonas* 属と川内湾泥土中の菌群の各種水銀化合物に対する MIC の分布を表 3 に示した。水俣湾水銀耐性 *Pseudomonas* の内 75 % の菌株は HgCl₂ の MIC が、50～100 μg/ml であったのに対し川内湾泥土由来の菌群のこの MIC 濃度を示すものはわずか 5 % にすぎなか

Table 3 Distribution of MICs to mercurial compounds

Genus	HgCl ₂ (μg/ml)					CH ₃ Hg(μg/ml)				
	5-10	10-20	20-50	50-100	100-150	0.025	0.05	0.1	0.5	1.0
Minamata Bay I.										
<i>Pseudomonas</i>	0	0	0	54	18	0	2	15	51	0
<i>Sendai Bay I.</i>										
<i>Pseudomonas</i>	2	1	3	1	0	0	2	0	6	0
<i>Bacillus</i>	23	17	4	0	0	1	7	12	24	1
<i>Vibrio</i>	0	1	3	2	0	0	0	1	4	2
<i>Corynebacterium</i>	3	0	1	0	0	0	1	2	1	0
Minamata Bay II.										
<i>Pseudomonas</i>	1	16	17	36		0	0	8	64	0
<i>Sendai Bay II.</i>										
<i>Pseudomonas</i>	1	1	5	0		1	0	5	1	1
<i>Bacillus</i>	9	20	18	0		4	8	31	1	7
<i>Vibrio</i>	1	0	4	2		0	1	6	0	0
<i>Corynebacterium</i>	3	0	1	0		3	0	1	0	0
						0.1-	0.5-	1.0-	5.0-	
						0.5	1.0	5.0	10	
						0-5	5-10	10-20	20-50	

った。一方 CH_3HgCl での MIC は両地点菌群の間で差は認められなかった。また $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$, $\text{C}_6\text{H}_5\text{HgOCOCH}_3$ では水俣湾由来の菌群が川内湾由来菌群に比べやや MIC が高い由来を示した。また水俣湾由来の $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ HgCl_2 添加寒天培地で発育してくる水銀耐性 *Pseudomonas* の全菌株（72株）は $\text{HgCl}_2 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加液体培地中, 25°C , 48時間振とう培養で平均 $61.0 \pm 16.6\%$ の HgCl_2 を揮発した。さらに、これらの菌の HgCl_2 の揮発化反応を詳細に調べた結果、発育至適温度、発育至適 pH 域、発育至適 NaCl 濃度で最も揮発化反応を行なうことが判明した。

考 察

水俣湾は高濃度の水銀を含んだ工場廃液により汚染され、この環境下の魚貝類を介して水俣病が発生した。今回我々が採取した泥土中には30年を経過した今でも、 $45.8 \mu\text{g/g}$ と他の海域の泥土水銀量に比べ高い値を示している。このようにいまだ高濃度の水銀を含んだ水俣湾泥土中には、対照地域として比較した、米之津および川内湾泥土に比べ菌相における *Pseudomonas* 属の占める割合が大であり、 $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ HgCl_2 添加寒天培地で発育してくる菌は全て *Pseudomonas* 属であった。また HgCl_2 に対する MIC が最も高いのも *Pseudomonas* 属であった。以上のことから水俣湾のように高濃度の水銀で汚染された泥土中では、*Pseudomonas* 属が水銀耐性菌として生棲し、水銀と相互反応を行なっていると推定された。一方川内湾泥土のように低濃度の水銀汚染泥土中にも $40 \mu\text{g}/\text{ml}$ HgCl_2 添加寒天培地で発育してくる菌が存在していた。Timoney et al.²⁾ は New York Bright の水銀量 $0.12 \sim 0.31 \mu\text{g}/\text{g}$ の泥土中の *Bacillus* 属が $\text{HgCl}_2 20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加寒天培地で発育することを、また Nelson と Colwell³⁾ も水銀量 $0.07 \mu\text{g}/\text{g}$ と非常に低い水銀量を示す泥土中

の菌が $\text{HgCl}_2 6 \mu\text{g}/\text{ml}$ 添加寒天培地で発育してくる菌が存在することを報告している。この様に水銀耐性菌は低濃度の水銀環境下においても、高濃度の水銀耐性を獲得して存在していると推定される。水俣湾泥土より分離した水銀耐性 *Pseudomonas* 属の全菌株は、 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ HgCl_2 添加液体培地から水銀を揮発化した。これは水銀耐性菌により HgCl_2 が Hg^0 に変換される為と考えられているが、水俣湾由来の水銀耐性菌によるその変換率は、ZoBell 培地中 25°C 48時間培養で $61 \pm 16.6\%$ であった。これ等の結果は実験室内で得られた値であり、実際の環境条件下での反応率を必ずしも反映しているとは考えられないが、汚染環境下での水銀の循環にこれ等水銀耐性菌が関与している可能性を示唆するものである。

文 献

- 1) Shewan, J. M., Hobbs, G., and Hogkiss, W. (1960). A determinative scheme for the identification of certain genera of gram-negative bacteria, with Special reference to the Pseudomonadaceae. *J. Appl. Bacteriol.* 23, 379-390.
- 2) Timoney, J. F., Port, J., Giles, J., and Spanier, J. (1978). Heavy-metal and antibiotic resistance in the bacterial flora of Sediments of New York Bright. *Appl. Environ. Microbiol.* 36, 465 - 472.
- 3) Nelson, J. D., Blair, W., Brinckman, F. E., Colwell, R. R., and Iverson, W. P. (1973). Biodegradation of phenylmercuric acetate by mercury-resistant bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 26, 321 - 326.

2. 微生物の水銀耐性獲得機構と水銀のメチル化・脱メチル化反応

北里大学薬学部

井村 伸正・芳生 秀光

食品中に含まれる水銀のほとんどがメチル水銀の形で存在しているという1967年のWestöö¹⁾の報告が自然界で水銀のメチル化反応が生起していることを強く示唆したのを受けて、環境中で微生物が他の水銀化合物からメチル水銀を產生するという研究成果が相次いで発表された。しかし微生物による水銀化合物の変換反応は決してメチル化のみではなく、メチル水銀を含むアルキルまたはアリル水銀のHg-C結合の開裂や無機水銀イオンを還元して金属水銀を生成する反応も多く多くの水銀耐性微生物によって触媒されることが次々に明らかにされた。(Table 1)

C. cochlearium T-2 が有する水銀をメチル化する活性因子

われわれは水銀をメチル化すると報告された微生物のうち最もメチル化活性が強いとされる*Clostridium cochlearium* T-2のメチル活性因子を検索し、この活性が熱に対して安定であり、蛋白分解酵素処理によても失活せず、透析によって内液から失われ、かつ可視光線照射に対して極めて強い感受性を示すを見出した。ついで菌

Table 1 Microorganisms having an activity of mercury biotransformation (-1979)

Hg^{2+}	\longrightarrow	$\text{R}-\text{Hg}^+$	$\text{R}-\text{Hg}^+$	\longrightarrow	Hg^{2+}	\longrightarrow	Hg^0
C. cochlearium		Pseudomonas K62					
N. crassa		Flavobacterium sp.					
E. coli		Pseudomonas sp.					
B. megaterium		S. aureus					
A. niger		E. coli J531					
M. phlei		S. marcescens					
P. fluorescens		Providencia sp.					
A. aerogenes		C. freundii					
S. brevicaulis		P. mirabilis					
E. aerogenes		E. cloacae					

体の粗抽出液からAmberlite XAD-II及びSP-Sephadex C-25を用いたカラムクロマトグラフィー等によりメチル化活性因子を分離し、これをメチルビタミンB₁₂(メチルコバラミン)と同定することが出来た。²⁾

C. cochlearium のプラスミド保有株(T-2P)によるメチル水銀の分解と水銀耐性獲得機構

メチル化因子検索の過程で、菌株を継代培養するうちに活性が消失するという現象にしばしば悩まされたわれわれは、試行錯誤の末に、そのメチル活性を失った菌株が逆にメチル水銀を分解する活性を発見していることを突きとめた(Fig. 1)。この分解反応の生成物は他のアルキル水銀分解活性を示す微生物の例とは異なり金属水銀のように培地中から揮散して失われることなく、無機の

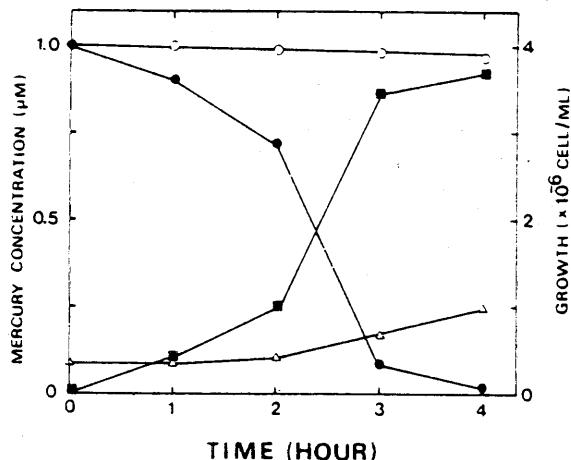


Fig.1 Decomposition of methylmercury and formation of inorganic mercury by C. cochlearium T-2P. C. cochlearium T-2P was grown anaerobically in nutrient broth containing 1 μM methylmercury at 30°C. Total mercury (○), methylmercury (●), and inorganic mercury (■) in the culture medium and the growth of C. cochlearium (△).

イオン型水銀として定量されることを確かめた。この分解活性が菌体をアクリジンオレンジで処理することにより失われることから、プラスミドの関与が予想された。分解活性を示す菌株（T-2P）からアクリジンオレンジ処理により活性を失った菌株（T-2C）へ接合により分解活性が転移すること、及び各菌株のDNAを抽出してアガロースゲル電気泳動により分析した結果から、このメチル水銀分解活性はプラスミドに由来することが確かめられた。³⁾

さらにTSI培地を用いてT-2P株にはH₂Sを産生する活性があり、この活性はcuringによって失われ、分解活性と同様に接合によってT-2C株に転移することなどから同様にプラスミド上にその形質の情報が存在していることが明らかとなった。⁴⁾なお、分解活性は水銀化合物の添加によって誘導され、基質特異性は従来報告されている分解酵素のそれと異なり、アリル水銀に比べてアルキル水銀の方がより分解されやすいことが判明した。⁵⁾

アクリジンオレンジ処理によって分解活性及びH₂S産生活性を失ったT-2C株は再び無機水銀からメチル水銀を産生する活性を示すようになった（Table 2）。⁴⁾

T-2P株とT-2C株を1:99の割合で混合して培養すると数代の継代培養によりT-2P株の数がT-2C株の数より多くなることも確かめられた。したがって最初にわれわれが保有していた菌株にはわずかながらT-2P株が存在し、継代培養を重ねるに伴い、その割合が増加し、そのためT-2C株の持つメチル水銀産生活性がマスクされ、T-2P株の持つ分解活性が強く発現するようになったものと理解することが出来た。³⁾

以上の結果からC. cochlearium T-2Pが示すアルキル水銀に対する強い耐性は、まず、水銀化合物の存在によって誘導された分解活性によりアルキル基が脱離し、生じた無機イオン型水銀を

Table 2 Mercury-methylating activity and cobalamin contents in the parent strain and the cured strain of C. cochlearium

Strain	Methylmercury formed (ng/6 × 10 ¹⁰ cells per liter)			Co determined ^a (ng/mg of protein)	
	-B ₁₂	+B ₁₂	Total Co ^a	CH ₃ Co	
Parent (T-2P)	ND ^b	ND	1.70	0.47	
Cured (T-2C)	960	1762	1.43	0.43	

^a Co, Cobalamin; CH₃ Co, methylcobalamin.

^b ND, Not detected.

同時に産生するH₂Sによって不溶性で不活性なHgSに変換して無毒化することで獲得されたものであると考えることが出来る。

メチル水銀産生活性の意義

上記の知見も含めて、微生物の水銀耐性獲得機序としては、(1)最終的に不活性な金属水銀またはHgSを生成する変換活性を持つ。(2)菌体内への水銀化合物の侵入を阻止する。(3)菌体内に多量のSH化合物を産生し保有する。ことなどが考えられて来た。C. cochlearium T-2Cをはじめとする微生物が示すメチル化活性は微生物自身にとって如何なる意味を持つかは未解明のまま残されて来たが、われわれはN-メチル-N-ニトロ-N-ニトロソグアニジンでT-2C株を処理することによってT-2CのビタミンB₁₂要求株を得ることに成功し、このビタミンB₁₂要求株と親株であるT-2C株及びT-2P株の水銀耐性を比較してFig. 2のような結果を得た。即ち、ビタミンB₁₂要求株はT-2C株とメチル水銀に対する感受性は変わらないが、無機イオン型水銀に対する活性はT-2Cに比べて明らかに低下している。⁶⁾一方、T-2C株から菌体抽出液を作製し、これを30,000×Gで遠心して得られた上清(S-30)による無細胞蛋白合成系に対する無機水銀とメチル水銀の阻害作用は明らかに無機水銀の方が強く、細胞内では無機イオン型水銀はメチル水銀よりも毒性が強いと考えられる。⁷⁾

これらの事実を考え合せて、C. cochlearium T-2Cの示すメチル水銀産生活性は菌体内で無機イオン型水銀をメチル水銀に変換することで弱毒化し、無機イオン型水銀に対する耐性を結果的に形成していると言うことが出来る。

結論

C. cochlearium T-2と命名された菌株につ

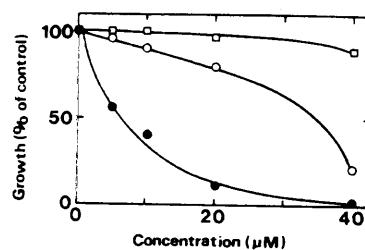
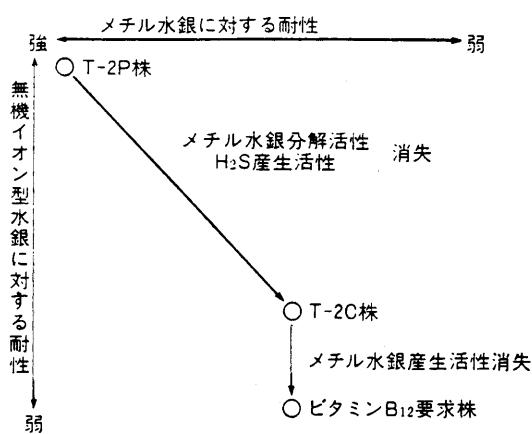


Fig. 2 Growth inhibition by HgCl₂. The organisms were grown anaerobically in a vitamin B₁₂ assay medium (Difco) supplemented with 25 ng/ml of vitamin B₁₂ and contained various concentrations of HgCl₂. Growth was measured by turbidity at 540 nm after 24 h incubation at 30°C. Symbols: (□); Clostridium cochlearium T-2P carrying a mercury-resistant plasmid (Pan-Hou et al. 1980), (○); C. cochlearium T-2C, (●); Vitamin B₁₂ auxotroph from T-2C



いて水銀の変換反応と耐性を検討した結果、1つの微生物種がプラスミドを保有するか否かで水銀のメチル化またはメチル水銀の脱メチル化という対称的な変換反応を触媒し、その反応がこの菌の水銀耐性獲得において重要な役割を果すことが明らかとなった。

文 献

- 1) Westöö, G., *Acta Chem. Scand.*, 21, 1790–1800 (1967).
- 2) Imura, N. et al., *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 1, 255–261 (1977).
- 3) Pan-Hou, H. S. K. et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, Dec., 1007–1011 (1980).
- 4) Pan-Hou, H. S. K. and Imura, N., *Arch. Microbiol.*, 129, 49–52 (1981).
- 5) Pan-Hou, H. S. K. et al., *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 6, 82–88 (1982).
- 6) Pan-Hou, H. S. and Imura, N., *Arch. Microbiol.*, 131, 176–177 (1982).
- 7) Pan-Hou, H. S. and Imura, N., *Bull. Environm. Contam. Toxicol.*, 29, 290–297 (1982).

3. 水圏における水銀の動態に関する研究

国立水俣病研究センター基礎研究部生理室

赤木 洋勝

自然環境において魚類が比較的高濃度の水銀を大部分メチル水銀の形態で含有していることはよく知られているが、その汚染機構については解明されない多くの問題を残している。これは主として、分析機器が高度に発達した今日においても各種の環境試料中に含まれる水銀化合物のうち、生物濃縮に係わる蓄積性の高いメチル水銀の分離分析が容易でなく、環境中におけるその動態が定量的に把握できないことに起因している。環境中水銀の大部分は底質中に存在することから、底質中の微生物と水銀とのかかわり合いが明らかにされつつあるが、環境中でのメチル水銀の生物濃縮に至る機構を解明するためには底質中でどの程度メチル水銀への変換が起こり、生成メチル水銀がどの程度水層に移行し終局的に魚体内に濃縮されるかについて総合的かつ定量的に評価すると共に、それらの過程を支配する環境因子を明らかにすることが重要であると思われる。

我々は放射性トレーサーと薄層クロマトグラフィーとを組合せた放射化学的手法により、河川モデルにおける底質、水質、魚などの各コンパートメントでの水銀形態変換反応を評価するとともに、種々の条件下での系内メチル水銀生成、生成メチル水銀の分布ならびに魚体内へのメチル水銀蓄積について定量的評価を試みている。ここでは、パルプ工場からの有機性廃液により汚染を受けているオタワ河（カナダ）の底質および河川水を用いた実験結果に基づき、河川系におけるメチル水銀の起源とその魚類への蓄積機構に関する知見を報告する。

実験方法

① 実験材料：用いた底質は次の3種である。

底質A：流れの速い河川中央部の砂、有機物含量0.44%，水分10.7%，総水銀8.8 ppbを含む。

底質B：一部腐敗したWoodchipsとシルトを含む砂、有機物含量4.4%，水分41.4%，総水銀28.2 ppb。

底質C：パルプ工場下流の底質で多量のWoodchipsを含む、有機物含量51.8%，水分80.7%，水銀含量115.3 ppb。

魚としては金魚（1—2 g）を購入し、河川水中で6週間馴化後実験に供した。

② 底質、河川水、魚体中における水銀の化学形態変換反応、底質については、乾燥重量当り0.1—10 ppmになるよう放射性塩化第二水銀または塩化メチル水銀を添加し、河川水に対しては0.05—1000 ppbの放射性水銀を加えて20°の暗所でインキュベートした。また魚については、1.0 ppbの放射性無機水銀またはメチル水銀を含む水中で一定時間水銀を取り込ませた後、水銀を含まない清水中で飼育した。

③ 底質—河川水—魚系におけるメチル水銀の生成と分布。上記3種の異なるタイプの底質中に乾燥重量当り1 ppmの放射性塩化第二水銀を添加したものを図1に示すガラス製チューブの底部に充填し、その上に1 lの河川水を底質を攪乱させないように静かに積層して金魚4尾ずつ飼育した。なお、魚に酸素を供給するために実験期間中約20 ml/min程度の空気を吹き込み、また魚の体重の2%に相当する市販餌を毎日1回与えた。さらに、底質の表面が魚の活動によって攪乱されるのを防ぐ目的で、底質の上部5 cmの位置にプラスチック製の網状スクリーンを付した。

④ 総水銀の分析：底質および魚については、サンプル1—3 g（湿重量）、水試料については5 mlをバイアルにとり、オートウェルガンマカウンター（NaI）を用いて測定した。とくに魚については、水10 mlを入れたバイアル中で個々の魚の放射能を生かした状態で放射能測定を行なった。

チル水銀量を求めた。

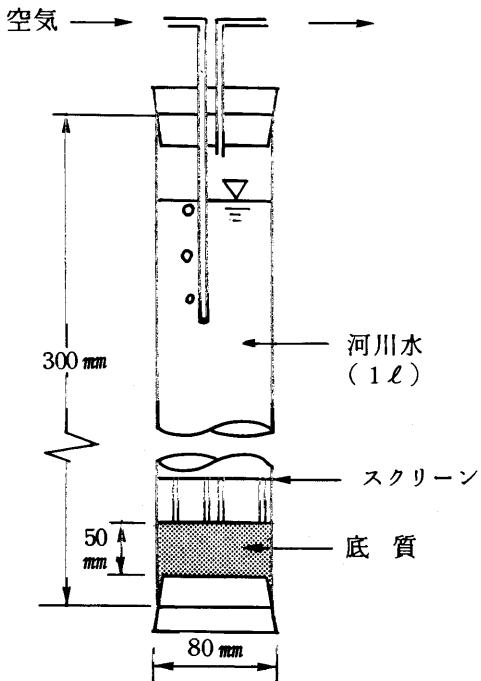


図1 実験モデル

⑤ メチル水銀の分析：総水銀の測定後、底質および魚についてはIN-KOH-EtOH 8mℓを加えて約30分間振り混ぜ、塩酸(1→5) 5mℓおよび0.1%ジチゾンベンゼン5mℓを加えて振とう抽出する。遠心分離後、ベンゼン層をフロリジルおよび無水硫酸ナトリウムの各0.5gを順次充てんしたカラムに通し、約1mℓを別のバイアルに受け、これにアンモニア水(1→10)10mℓを加えて振り混ぜ、過剰のジチゾンを除去する。ベンゼン層から0.5mℓを正確にとり放射能を測定して完全な抽出効率を確認したのち、N₂ガスを吹きつけて溶媒を留去する。残渣は少量のアセトンに溶解しながらシリカゲル薄層上に塗布する。また同時にコールドの無機水銀(II)およびメチル水銀の各ジチゾネットをマーカーとして塗布し、n

ヘキサンベンゼン(1+1)で展開する。展開後、薄層シートを、原点、無機水銀、メチル水銀および溶媒のみの4つの部分に鉄で切り離し、各部分の放射能を測定する。これらの各部分の放射能を合わせた総放射能量に対するメチル水銀部分の放射能量の比を求め、この値と総水銀値から試料中に含まれるメチル水銀量を算出した。

一方、水試料については、試料50—100mℓをとり、弱酸性下にKMnO₄を10⁻⁴M程度になるように加えて数分間放置したのち、0.1%ジチゾンベンゼン5mℓで抽出し、そのベンゼン層について、以下前述の場合と同様操作し、水中に含まれるメ

結果および考察

(1) 放射化学的手法による超微量メチル水銀の分離方法

水銀化合物の環境内動態を評価するためには、水中に含まれるpptレベルの水銀の化学形態まで明らかにしうる高感度の分離分析法が要求される。環境中に生成される有機水銀はメチル水銀のみであり、また環境中に存在する水銀濃度では無機水銀態の水銀との間の同位体交換反応は起こらないことが確かめられたことから、放射性水銀を用いる放射化学的手法により実験モデル内の微量水銀の化学形態別の挙動を評価することが可能となった。本研究において確立したメチル水銀分析法は各種試料中に含まれる水銀化合物を不揮発性のジチゾネットとしてベンゼンに抽出し、薄層クロマトグラフィーにより分離して測定しようとするものである。本法により簡便にメチル水銀を測定するには薄層クロマトグラフィー分離に先立って試料中のすべての水銀化合物を効率よく抽出することが望ましいが、水銀に対して強いキレート能を有するジチゾンを用いても各試料中からの抽出は容易でなく、各試料ともある種の前処理を行なうことによる満足すべき結果が得られた。魚の場合、生体試料等のPCBs分析における前処理法として用いられている蛋白質のアルカリ分解法を応用したところ、IN-KOH-EtOHを加えて振り混ぜるだけで魚肉がほとんど完全に可溶化され、魚体中の水銀が塩酸性下に容易にジチゾネットとして抽出されることがわかった。また底質についても同様な処理を行なうことにより効率よく抽出分離できることが認められたが、これは底質中で水銀化合物をトラップしていると思われるフミン質がアルカリ処理により溶解し、水銀イオンが遊離しやすくなるためと考えられる。また、水層中の水銀については、塩酸性下にジチゾンベンゼンにより常に効率よく抽出されるとは限らず時間の経過と共に抽出率が低くなる傾向が観察されたが、この場合、水層がかすかに着色する程度のKMnO₄(10⁻⁵—10⁻⁴M)を加えることにより水層中の水銀がほとんど完全に抽出されるようになることが判明した。このことは、水層中の水銀が一部金属水銀として存在することを示唆しており、これがKMnO₄により酸化されてジチゾンとのキレートを形成するために抽出効率が向上するものと考えられる。なお、これらの前処理によるメチル水銀の分解は認められなかった。無機水銀(II)

表1 実験モデルにおけるメチル水銀生成とその分布についての分析例(21日後)

System	Sample	Total Mercury	Recovery	Chemical Form of Mercury		
				Inorganic	Methyl	% Methyl
(A) Sand	Water	0.259 ppb	103.8 % 114.3	0.161 ppb 0.160	0.098 ppb 0.099	37.80 % 38.07
	Sediment	904.63	123.3	888.95	15.65	1.73
		936.29	121.8	919.17	17.13	1.83
	Fish	185.31 (1.34g) 153.10 (1.24) 108.35 (1.61) 164.23 (1.57)	118.5 113.3 118.7 109.9	69.16 58.40 44.73 66.64	116.15 94.69 63.62 97.59	62.68 61.85 58.72 59.42
(C) Woodchips	Water	0.064	109.2 105.0	0.024 0.025	0.040 0.039	62.52 61.02
	Sediment	1041.92	106.1	961.05	80.85	7.76
		1100.68	108.2	1015.40	85.30	7.75
	Fish	25.67 (1.26) 33.99 (1.11) 29.49 (1.49) 34.81 (1.33)	119.9 117.3 112.2 121.7	1.51 3.62 2.73 3.86	25.16 30.37 26.76 30.95	94.13 89.34 90.74 88.90

とメチル水銀のジチゾネートはシリカケール薄層を用い、ベンゼン一ヘキサン(1+1)、石油エーテル一アセトン(9+1)、石油エーテル一酢酸エチル(9+1)等で展開するとき明瞭に分離され、無機およびメチル水銀ジチゾネートのRf値はいずれの展開溶媒の場合でもそれぞれ0.25—0.35および0.60—0.75を示し、無機水銀およびメチル水銀部分以外の部分には、放射性水銀の存在はほとんど認められなかった。

底質中に1 ppmの無機水銀を添加した実験モデルについて、底質、水層および魚に含まれる水銀の分離分析を行なった結果を表1に示したが、各試料とも含有水銀が効率よく抽出されており、測定値のバラツキも小さく、精度の高い分離分析法といえよう。

(2) 各種試料中における水銀の化学形態変換

底質的での無機水銀→メチル水銀の変化を図2に示す。底質中においてはメチル水銀生成反応と分解反応が同時に起こり、時間が経過と共に各底質毎に一定のメチル水銀レベルに達することが伺える。底質中におけるメチル水銀生成反応は底質中水銀濃度が低いほどメチル水銀生成率が高くなることが認められた。すなわち、同一の底質に、0.1, 0.5 および10 ppmの塩化第二水銀を加えて4週間後のメチル水銀生成率を測定したところ、それぞれ7.8, 5.2, および1.4%であった。河

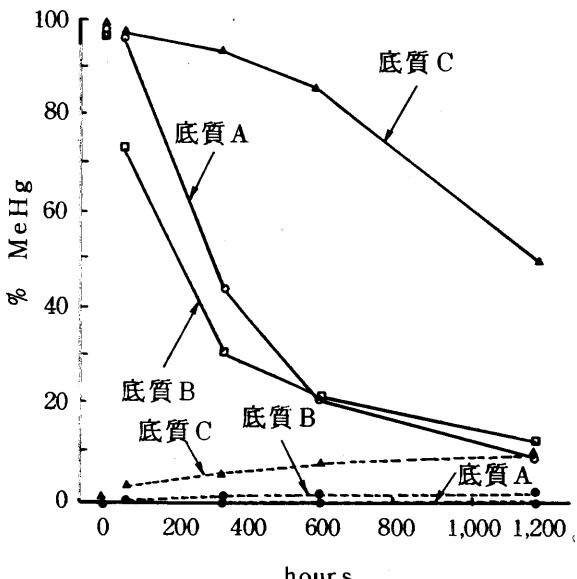


図2. 底質中のメチル水銀の生成と分解

川水に関しては0.1—1000 ppb濃度範囲でメチル水銀への変換は全く認められず、メチル水銀の分解のみが観察された。この河川水中でのメチル水銀の分解反応は1—10 ppbの範囲でとくに顕著であり、加えたメチル水銀は10日も経てばほとんど無機態に変化することが認められたが、1000 ppb以上ではメチル水銀は極めて安定で、また逆に0.1 ppb極低濃度のメチル水銀は河川水中で比較的安定に存在しうるという興味深い結果を得た。

表2 実験モデルにおける水銀の化学形態別分布と濃度係数

Type of Sediment	Mercury in Sediment (ppb)			Sediment/Water Partition Coeff.		Hg in Whole Water (ppb)			Avg. Methyl Hg in Water (ppb)	Methyl Hg in Fish (ppb)	Methyl Hg Uptake Rate (hr ⁻¹)
	Inorg.	Methyl	% Methyl	Inorg.	Methyl	Inorg.	Methyl	% Methyl			
Sand	800	16.0	2.0	4,000	170	.204	.095	32	.063	92.9	2.9
Silt and Woodchips	960	69.4	7.2	9,800	760	.112	.103	48	.069	112.0	3.2
Woodchips	1048	93.5	8.9	50,000	4200	.023	.031	57	.021	28.1	2.7

また、魚体内での水銀の変化を調べるために、無機水銀およびメチル水銀を取り込んだ金魚を清流に放流し、約1ヶ月後に体内に残存する水銀の化学形態を調べたところ、無機水銀を取り込んだ魚（4尾）はわずか数 ppb の総水銀が残存していたにすぎなかつたが、その99%以上は無機の形態であった。一方メチル水銀を含む魚（4尾）での排泄速度は極めて緩かで、1ヶ月後でもその形態はメチル水銀のままであった。これらのことから、河川系のメチル水銀の起源としてのメチル水銀生成については底質が重要な役割を果しているものと考えられる。

(3) 実験モデルにおけるメチル水銀生成とその分布

各実験モデル系でのメチル水銀生成とその分布状態を調べるために、実験方法に従って底質一水一魚の系を作成し、3週間にわたって系内の各コンパートメントに含まれる総水銀およびメチル水銀を測定した結果、どの系でも底質中メチル水銀生成は初期に比較的速やかにおこり、1週間以上ほぼ一定のメチル水銀レベルを保つことが観察されたが、これは前述のように底質中ではメチル水銀の生成と分解が同時に起こることから、その両者の作用により一定の平衡状態が形成される解釈される。メチル水銀生成能は底質の種類により異なり、底質Aでは2%程度あったのに対し、有機物含量の高い底質Cでは8.9%にも達した。水層に移行した水銀は総水銀として ppt レベルであったが、水層中水銀のうちメチル水銀の占める

割合は砂の系でも3週間後30%を示し、他の系では60%に達することが認められた。こうした水銀分布は魚を含まない系でもほぼ同様であった。

魚体内に蓄積した水銀を分析すると、3週間後に、総水銀として底質Aの系では110—185 ppb(平均153 ppb)、底質Bの系で114—127 ppb(平均124 ppb)、底質Cの系ではかなり低い25—35 ppb(平均31 ppb)を示し、その内メタル水銀の占める割合は、それぞれ58.7—62.5%(平均60.6%)、89.2—92.2%(平均91.1%)および88.9—94.1%(平均90.8%)であり、大部分がメチル水銀として蓄積されていることがわかった。3週間後の分布を平衡状態と見なし、各系の水銀濃度分布から濃度係数を求めると、表2のようになり、底質中で生成したメチル水銀は無機水銀よりはるかに容易に底質から溶離して水層に移行し、水中のメチル水銀はその濃度に応じて一定の速度で魚体内に蓄積され、比較的短時間に魚体内的水銀が大部分メチル水銀として保有されることを示している。また、前述のように、各系での水銀の分布状態は魚の有無に関係なく一定であったことは、魚への水銀蓄積は水層からの水銀の取り込みが律速段階であることを示唆している。以上の結果から、水銀の生物濃縮に関しては、底質の特性によって決定される水圈での水銀とくにメチル水銀の分布状態が支配するところが大きく、さらに今後、水圈でのメチル水銀の生成とその分布に及ぼす環境要因を明らかにすることによって、複雑な水銀による環境汚染の機構解明の手がかりがつかめるものと考えられる。

4. メチル水銀の生体内動態に関する研究 —マウスにおけるメチル水銀の生体内分布—

国立水俣病研究センター基礎研究部生化学室
平山紀美子

メチル水銀の生体内分布、生物学的半減期、中毒発現時期などに巾広い変動が認められることが、人や動物においていくつか報告されている。これらの原因を明らかにすることは、各組織におけるメチル水銀の蓄積および糞尿中への排泄の機序、並びにこれらに影響を与えていた因子の解明に役立つと考えられる。そこで我々は、実験モデルとして数種の純系マウスを用いてメチル水銀の生体内分布および排泄の系統差を検討し、メチル水銀の尿中への排泄に著明な系統差が存在することを認めた。

さらに、性差並びに週齢差を検討し、いくつかの知見を得たのでここに報告する。

実験方法

実験 1 メチル水銀動態の各系統における性差。
雌雄の C57 BL/bN (B6) や BALB/cA (C) マウス (7 週齢) の各々 5 匹ずつに、5 mg/kg の塩化メチル水銀 (MMC) を経口投与し、代謝ケージにて飼育、24 時間の糞尿を採集した。以下投与量はすべて 5 mg/kg とした。24 時間後、ネンブタール麻酔下に腹部大静脈より採血、生理的食塩水で環流し、各組織を摘出した。全血、血漿、脳、肝、腎、糞尿中の水銀含量を酸化・燃焼一金・アマルガム法 (杉山元水銀分析計 MV 253 R) を用いて測定した。同様にして、MMC 静注 5 分後の臓器水銀量を測定した。

実験 2 メチル水銀の生体内分布、糞尿排泄の経時的变化における性差。

雌雄の B6 (7 週齢) 各々 5 匹ずつに MMC を経口投与後、1, 3, 5 日間の糞尿を採集するとともに、各時期における血液、臓器をとり出し、それぞれの水銀量を測定した。

実験 3 メチル水銀動態の各週齢における性差
雌雄の B6 (2, 4, 7, 10, 45 週齢) 各群 4

～6 匹を実験 1 と同様に処理し、24 時間後の糞尿、血液、臓器中水銀含量を測定した。

実験結果

実験 1

MMC 投与後 24 時間の尿中排泄水銀量の雌雄差は、両系統とも、雄 > 雌 (B6 は 8 倍、C は 3 倍) と著明であり、又、この系統差は雄において B6 > C (3 倍) であったが、雌での系統差は認められなかった (Fig. 1)。糞中排泄水銀量には、性、系統による有意の差は見られず、メチル水銀動態における尿への排泄の重要性を示している。

MMC 投与 24 時間後、両系統とも腎水銀量は、雄 > 雌 (B6 は 2.4 倍、C は 3 倍)、脳、肝水銀量は逆に雌 > 雄であった (Fig. 2)。雄の系統間では、脳水銀量は B6 > C、肝水銀量は C > B6 であり、雌の系統差はどの臓器にも認められなかった。

全血水銀濃度および水銀の血漿対全血比は、両系統において雌 > 雄であり、系統間では雌雄とも全血水銀濃度は C > B6、水銀の血漿対全血比は B6 > C であった (Fig. 3)。

MMC 静注 5 分後、腎水銀量にのみ雄 > 雌と性差が認められ、メチル水銀分布の性差における腎の特異性を示している (Fig. 4)。系統差は、脳、腎、血漿水銀量に認められ B6 > C であった。

実験 2

MMC 経口投与後の B6 (7 週齢) において、1, 3, 5 日間に排泄された尿中水銀量は、投与後 5 日まで雄が著明に高く、5 日間の糞尿中排泄水銀量の総計は、雄が雌の約 2 倍であった (Fig. 5)。

5 日目の脳内水銀量は、雌 > 雄 (2 倍) で、1, 3 日目に比し性差が著明となった (Fig. 6)。雄の腎水銀量は 1 日目から 3 日目にかけて急激に減

少し、1日目で雄>雌(2倍)であったものが、3日目には性差が認められなくなり、5日目では雌>雄の傾向を示した。

肝水銀量および全血水銀濃度はどの時点においても雌>雄であり、肝でその差は時間とともに少くなる傾向を示したのに対し、全血でその差は経時に増加する傾向を示した。

実験 3

尿中排泄水銀量の各週齢内での性差は、2週齢を除き雄>雌と著明であったが、糞中水銀量はどの週齢においても性差が認められなかった(Fig. 7)。週齢間の尿中排泄水銀量は、雌雄とも2週齢で最も少く、4, 7週齢にピークがあり、10, 45週齢と低下する傾向を示した。糞中水銀排泄量は雌雄ともに7, 10週齢でやや高く他の週齢では有意差が認められなかった。

臓器内水銀量の各週齢内における性差は、2週齢以外の他の週齢で、腎では雄>雌、脳、肝では、雌>雄とその差は著明であった(Fig. 8)。週齢差は、雌雄ともに脳では2週齢のみが著明に水銀量が高く、他の週齢では有意差は認められなかつた。雄の肝水銀量は、加齢と共に増加する傾向を示し、腎水銀量は、2週齢において最も少く、4, 7週齢と増加を示したが、一方、雌では著明な差が認められなかつた。

全血水銀濃度および水銀の血漿対全血比は、7, 10週齢において性差があり雌>雄であった(Fig. 9)。

考 察

B 6において、MMC投与後24時間の尿中排泄水銀量は、雌雄ともに4週齢から著明に増加し、7週齢近くでピークを示し、10, 45週齢と加齢とともに減少した。このことは、マウスの性成熟が約5週齢とされていることを考慮すると、第二次性徴の発達段階によって尿中排泄水銀量が変動

しており、性ホルモンが影響していることが推測される。加齢に伴う尿中排泄水銀量の減少は、老化に伴うホルモン分泌の低下に起因することも考えられる。4週齢以後の尿中排泄水銀量は、著明な性差を示し、雄で高い値を示すことは、性ホルモンのうち特に男性ホルモンが関与していることを示唆している。

MMC投与24時間後、脳、肝の水銀量は、雄が雌に比し尿中排泄水銀量が多い事を反映して低値を示したが、逆に腎では著しい高値を示した。

この結果からメチル水銀の腎への移行の相違が、尿中排泄水銀量の多少に影響を与えていることが考察される。

メチル水銀静注5分後、腎水銀量にのみ雄>雌と性差が認められたこと、雄の腎水銀量が1日目から3日目にかけて急激に減少したことなどの実験結果は、上記の考察を裏付けるものであろう。尿中排泄水銀量の著明な性差に起因すると考えられる5日目の脳内水銀量の著しい性差の出現は、神経症状発現にも性差があり得ることを示唆している。

雄の尿中排泄水銀量の系統差は、水銀の血漿対全血の比に系統差があることから、ヘモグロビンの親和性の相違に由来するとも考えられる。しかし、遺伝的背景が同一である雌において、尿中排泄水銀量に系統差が認められず、系統差の出現が单一因子のみによる支配でない可能性を残している。

以上の結果、メチル水銀の尿中排泄において男性ホルモンの関与があり、このホルモンの腎機能への作用を介してであろうことが示唆された。又、このホルモンの作用がメチル水銀の生物学的半減期、さらには中毒発現時期の性差、年齢差を惹起していることが推測される。男性ホルモンとメチル水銀動態との接点がどこにあるのか、詳細に検討する予定である。

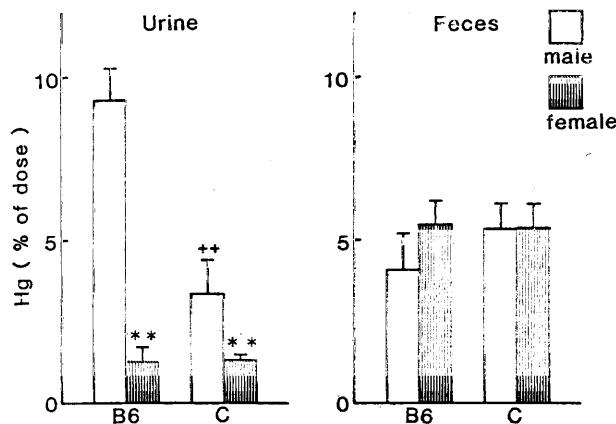


Fig. 1 Sex and strain differences in mean (\pm S.D.) mercury excretion. Male and female C57BL/6N or BALB/CA mice were P.O. administered methylmercury chloride (5mg/kg) and their urine and feces were collected for 24 hr.

- * * Significant within strain sex difference ($P < 0.01$)
- + + Significant within sex strain difference ($P < 0.01$)
- N=5

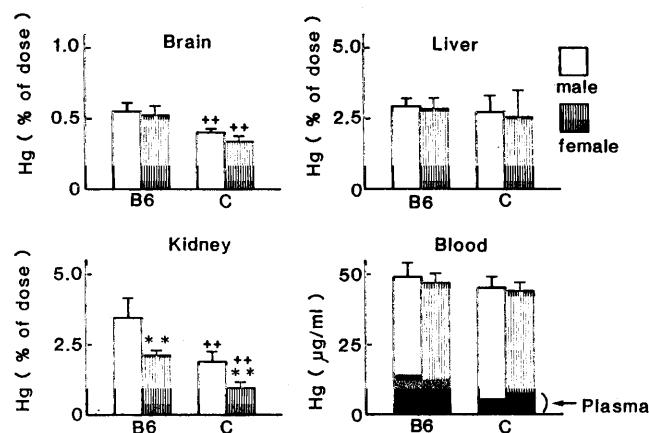


Fig. 4 Sex and strain differences in mean (\pm S.D.) tissue mercury levels. Male and female C57BL/6N or BALB/CA mice were I.V. injected with methylmercury chloride (5mg/kg) and they were sacrificed 5 min. after injection.

- * * Significant within strain sex difference ($P < 0.01$)
- + + Significant within sex strain difference ($P < 0.01$)
- N=5

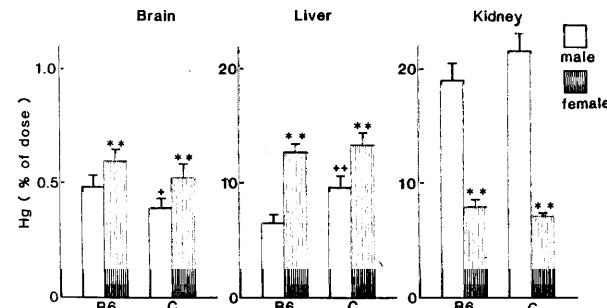


Fig. 2 Sex and strain differences in mean (\pm S.D.) tissue mercury levels. Experimental conditions were same as described in Fig. 1.

- * * Significant within strain sex difference ($P < 0.01$)
- + + Significant within sex strain difference ($P < 0.01$)
- N=5

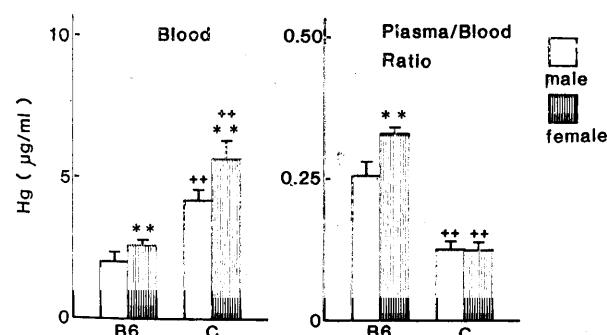
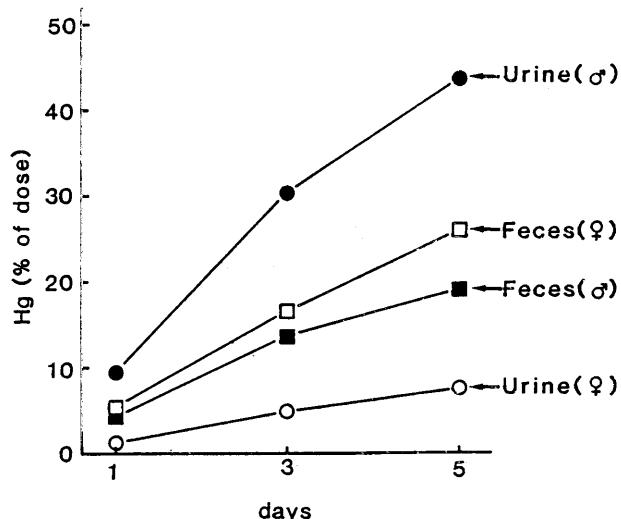


Fig. 3 Sex and strain differences in mean (\pm S.D.) blood mercury levels and plasma/blood ratio of mercury. Experimental conditions were same as described in Fig. 1.

- * * Significant within strain sex difference ($P < 0.01$)
- + + Significant within sex strain difference ($P < 0.01$)
- N=5

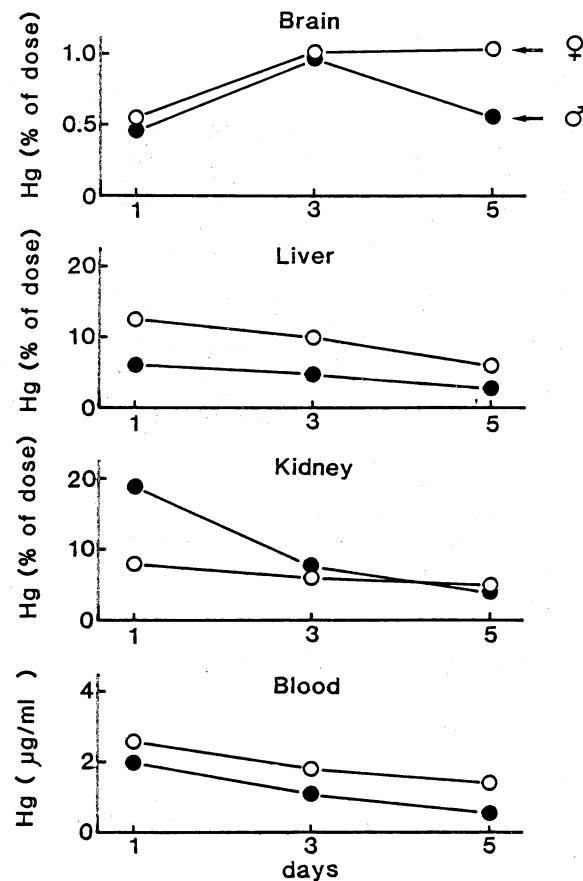


Fig. 6 Sex differences in mean (\pm S.D.) tissue mercury levels at various times. Male and female C57BL/6N mice (7 weeks) were P.O. administered methylmercury chloride (5mg/kg) and they were sacrificed 1, 3 and 5 days after administration.

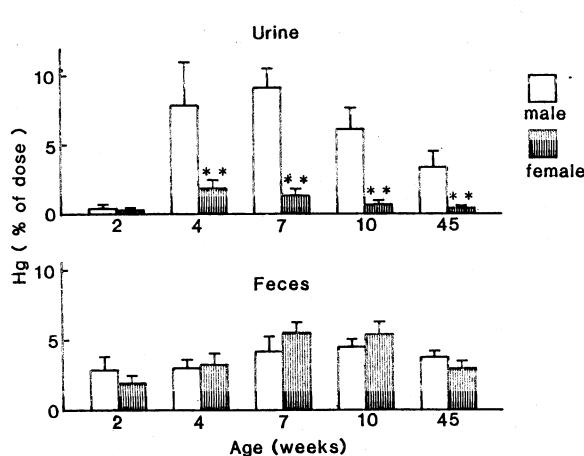


Fig. 7 Sex and age differences in mean (\pm S.D.) mercury excretion. Male and female C57BL/6N mice (2, 4, 7, 10 and 45 weeks) were P.O. administered methylmercury chloride (5mg/kg) and their urine and feces were collected for 24 hr.

* * Significant within age sex difference ($P < 0.01$)
N=4-6

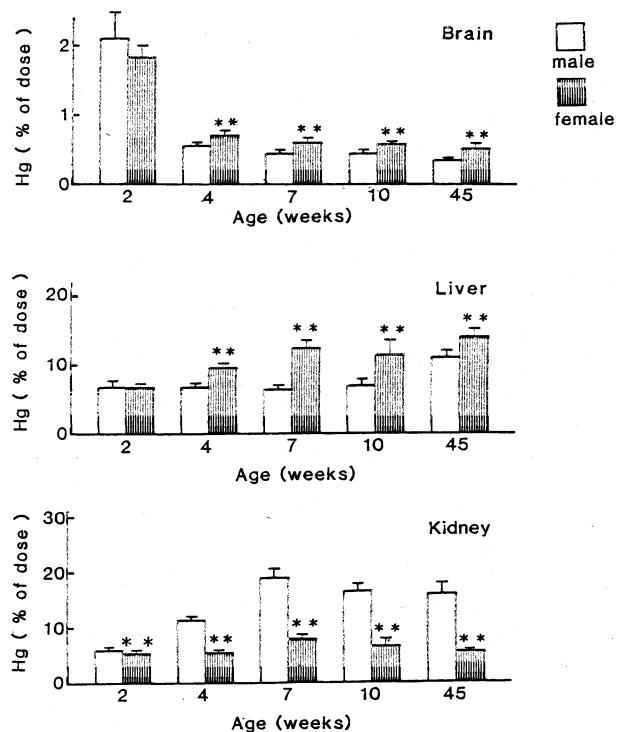


Fig. 8 Sex and age differences in mean (\pm S.D.) tissue mercury levels. Male and female C57BL/6N mice (2, 4, 7, 10 and 45 weeks) were P.O. administered methylmercury chloride (5mg/kg) and they were sacrificed 24 hr after administration.

* * Significant within age sex difference ($P < 0.01$)
N=4-6

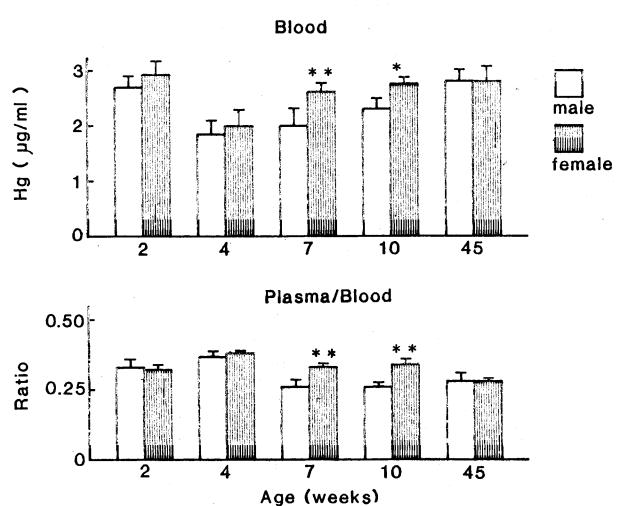


Fig. 9 Sex and age differences in mean (\pm S.D.) blood mercury levels and plasma/blood ratio of mercury. Experimental conditions were same as described in Fig. 8.

* * Significant within age sex difference ($P < 0.01$)

5. 妊娠中に母体を通じて有機水銀に曝露されたマウスの生後観察

国立水俣病研究センター基礎研究部病理室

井上 稔

妊娠中に摂取されたメチル水銀は容易に胎児に移行し、その結果重篤な神経障害をひきおこした例が多く報告されている^{1, 10, 14, 15, 18, 23, 24)}。動物実験によても、メチル水銀が胎仔の中核神経の発達を障害することが確かめられている^{5, 8, 11)}。また妊娠中にメチル水銀に曝露された動物が、生後、探索行動、学習、運動能力などに異常を示すことも報告されている^{3, 16, 19, 21, 22)}。これらの実験で、メチル水銀が動物に与えられた時期はすべて、胎芽の器管形成期にあたっている。しかしながら、武内^{2, 3)}は、胎児性水俣病患者の場合、脳の障害は妊娠の後半に至ってから引きおこされたものと推定すべき剖検所見を得ている。ラットでも妊娠の後期になるほどメチル水銀の胎仔移行が増加するという報告がある^{17, 25)}。

本研究では、脳の発達状況からみて、ヒトの妊娠3ヶ月から6ヶ月程度に相当する、マウスの妊娠13日から17日¹³⁾にメチル水銀を母獣に投与し、産仔にあらわれる長期的な行動変化と脳の形態学的变化について検討した。

方 法

実験動物には近交系のC 3H/He N マウスをもちい、12週齢以上の雌雄を一夜同居させた翌朝、陸栓のみられたものを妊娠0日とした。最初、妊娠14, 15, 16日のうち1回、塩化メチル水銀を体重あたり20 mg/kg, 25 mg/kg または30 mg/kg 経口投与したところ、25 mg/kg 以上の投与では産仔が生存しなかった。そこで今回は20 mg/kg 投与量で実験をおこなった。

60匹の妊娠マウスを5つのメチル水銀投与群と対象群に各々10匹ずつ配分した。さらに同数の妊娠マウスを里親用に用意した。塩化メチル水銀は水溶液とし、妊娠13日から17日のいずれかの日に1回20 mg/kg を経口投与した。投与後は、糞、

尿を通じての水銀再摂取を防ぐため、すべて金鋼底の単独ケージに飼育し、出産前日に木屑入りケージに移して自然分娩させた。新生仔は、母乳を通じての水銀摂取を防ぐため、生後24時間以内に里親につけて飼育した。メチル水銀投与を受けた母獣は出産後殺して、子宮の着床数を調べた。

出生仔は毎週1回体重を測定し、行動異常について観察をおこなった。図1に示したように多くの仔獣が生後1週間以内に死亡したので、比較的生存仔の多い、妊娠14日と17日処理群の雄についてのみ、3週齢から8週齢までの自発運動量を、Automex II (Columbus Co., Ltd.)をもちいて測定した。

生後10-12週で動物を殺し、脳をとり出して光学顕微鏡的観察をおこなった。

結 果

出産は、通常妊娠19日の早朝おこなわれるのに對し、メチル水銀投与群では数時間の遅れが観察された。産仔に外表奇形はみつかなかったが、多くのものは乳を吸うことなく死亡した。胃に乳汁の観察されたものでも、生後1週間以内に死亡する例もあり、離乳率は極めて低かった(図1)。生後の体重増加は対照群に比べていくぶん少なかったが、生存個体数の少ないこともあって、統計的に有意差のみられたものは、妊娠14日に処理された雄のみであった。

自発運動量は、妊娠14日および17日処理群とも生後5週齢頃まで対照群と大きな差はみられなかつたが、その後、運動量の増加率が鈍化し、ほぼ直線的に増加する対照群との間に差が明らかとなつた(図2)。

すべてのメチル水銀処理群に軽度の行動障害を示す個体が出現した。妊娠13日から16日までのいずれかの日に処理した個体のほとんどすべてと、

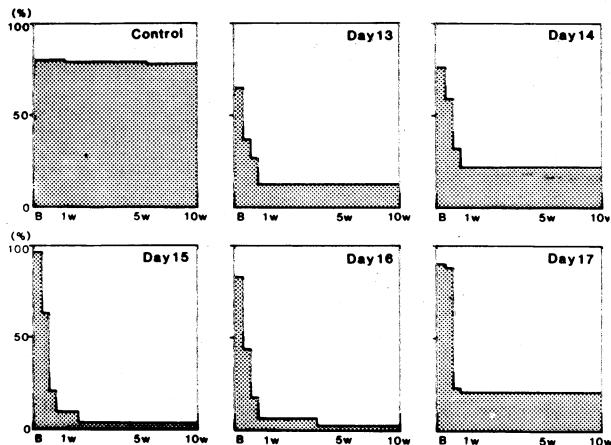


図1. 妊娠13日から17日のいずれかに1回、塩化メチル水銀を 20 mg/kg 経口投与されたマウスから産まれた仔の全着床数に対する生存率。

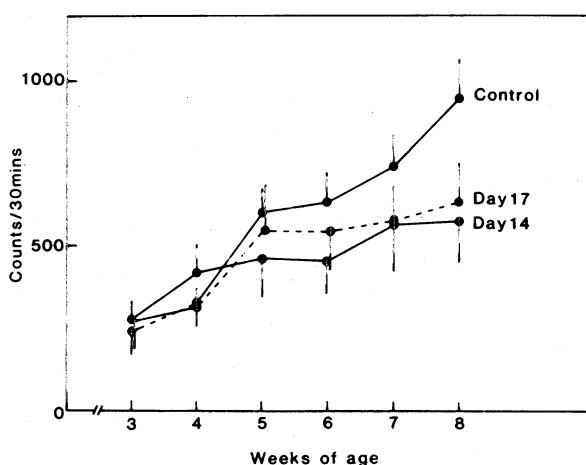


図2. 妊娠14日または17日にメチル水銀を投与された母親から産まれたマウスの、生長とともに自発運動量の変化。毎週1回、30分間の自発運動数（平均±SE）。

17日処理群のほぼ半数のものでは、約40 cmの高さから落とした時の立ち直り姿勢が不安定であった（図3）。また歩行中の尾の位置が低かった（図4），尾をもって下垂した時、後肢の過屈曲をおこす例もあった。このような行動異常の程度と、処理された妊娠日の違いとの関係は明瞭ではなかったが、妊娠の早い時期に処理された群の方が妊娠末期に処理された群より重篤な傾向にあった。

生後10-12週に測定した脳の重量は、どのメチル水銀処理群も対照より小さい傾向にあったが

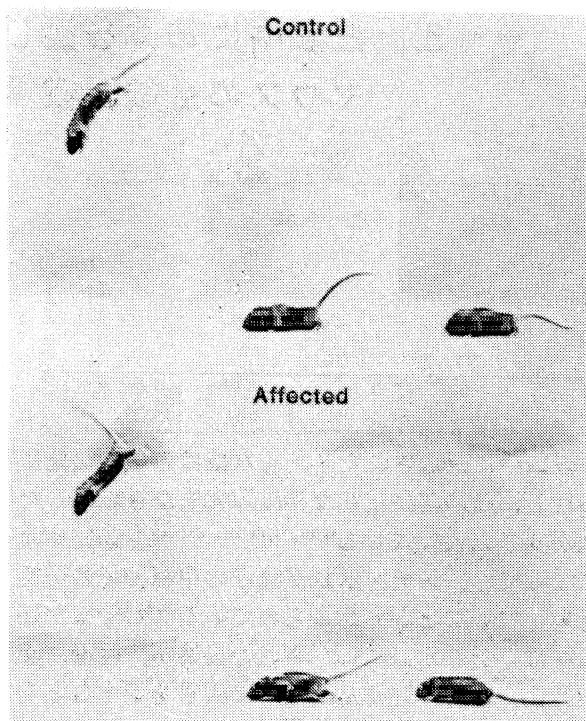


図3. マウスを約40 cmの高さから落とした時の立ち直り運動（モータードライブ撮影）。本文参照。

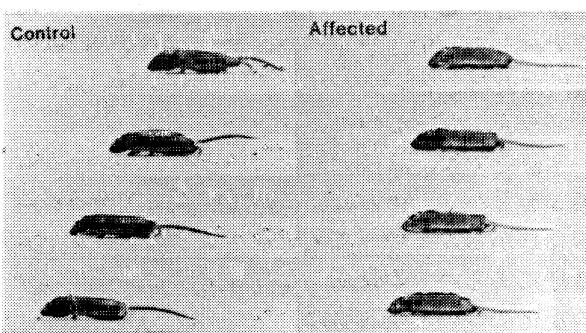


図4. モータードライブで撮影したマウスの歩行の様子。正常なマウスは尾を上げて歩行するのにに対し、メチル水銀の影響をうけたものの尾は地に接している。

（図5），個体数が少なかったためか、統計的有意差のみられたのは、妊娠13日と14日に処理された雌の脳のみであった。

組織学的には、観察したすべての脳で、側脳室がやや拡大しており、それだけ被殻尾状核が小さかった（図6）。大脳外套の組織構築はよく保たれており、間脳、中脳にも組織傷害はみつからなかった。

小脳は、近交系マウスであるため、対照群の小脳回のパターンが個体差なくよく揃っていた¹²⁾。

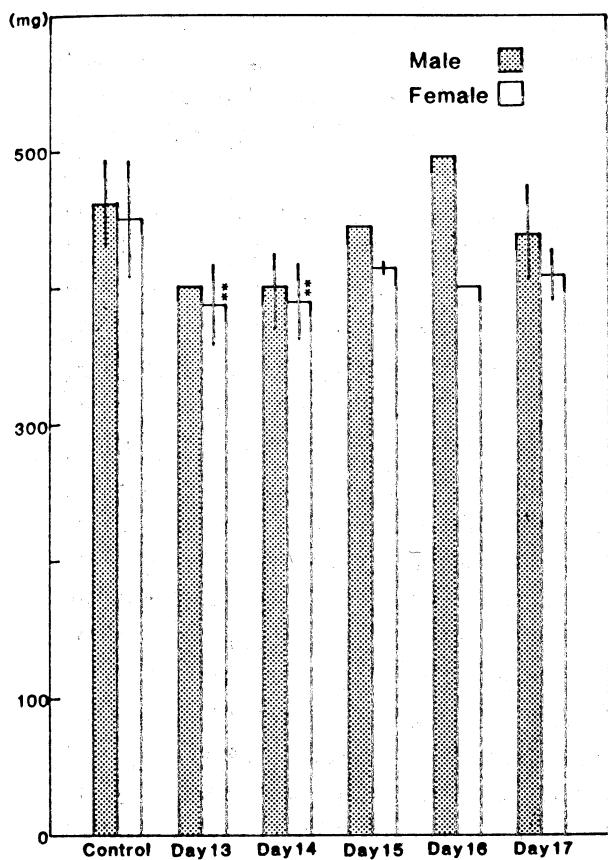


図5. 生後10—12週齢の脳の重量(平均±S.D., S.D.の示していないグラフは標本数1)。
** 対照群と比べて統計的有意差のみとめられたもの($P < 0.01$, Student両側t-検定)。

これに比べ、メチル水銀処理をうけたマウスでは、様々な程度に小葉の分葉が抑制されていた(図7)。その程度は妊娠13日あるいは14日処理群の方が他の処理群より重篤な傾向にあった。しかし小脳の皮質構築はよく保たれていた。

考 察

これまでの多くの動物実験によって、胎仔毒性を現わすメチル水銀の量と、胎仔致死作用を現わす量の幅は極めて小さいことが知られている¹⁸⁾。今回の実験では、より重篤な行動異常を観察する目的で、出生仔が生存できる最大量のメチル水銀を母獣に投与した。しかし、神経障害の突然変異をもった動物にみられるような重篤な行動障害^{7, 20)}も、小頭症のような脳の奇形もみられなかった。Fuyutaら⁹⁾は妊娠中のメチル水銀曝露によって胎仔に水腎症の成立することを報告しているので、

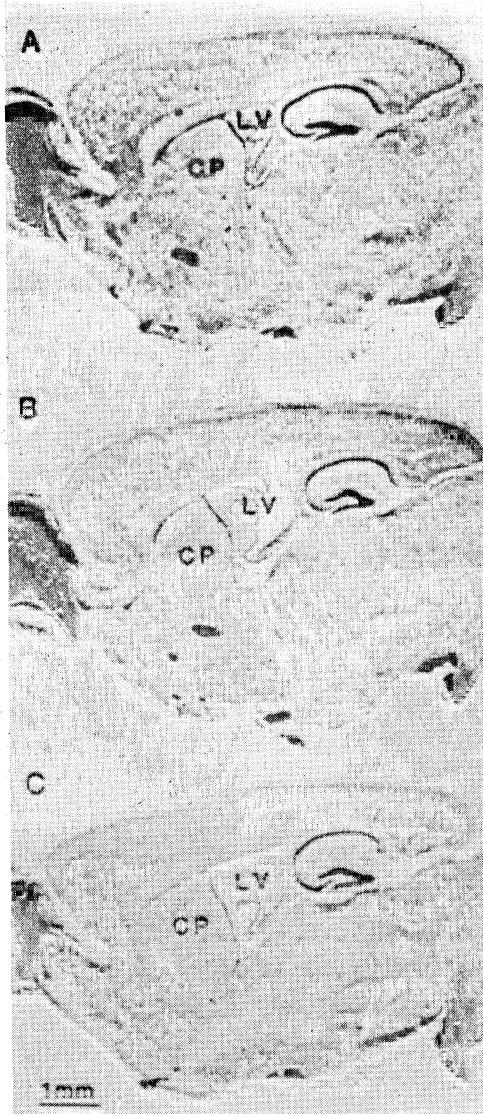


図6. 妊娠14日または17日にメチル水銀を投与された母親から産まれたマウスの脳の正中矢状断、側脳室(LV)が拡大し、それだけ被殻尾状核(CP)が小さい。

今回の実験でも、重篤な脳の傷害をもつ仔獣は、生存に必要な他の臓器の傷害も合併し、生存しなかったものと推定できる。

今回観察された自発運動の変化、立ち直り姿勢、歩行姿勢の異常などは、知覚、運動の伝導路および筋肉までも含めて、そのひとつあるいは複数の障害の結果と考えられる⁶⁾。ChangとReuhl⁴⁾は胎生期のメチル水銀曝露により、小脳ブルキンエ細胞や顆粒細胞に長期的な微細変化のおこることを報告しており、またBartolomeらは神経伝達物質に変化のおこることを報告している。今回観察された側脳室の拡大や、被殻尾状核、小脳の低形成

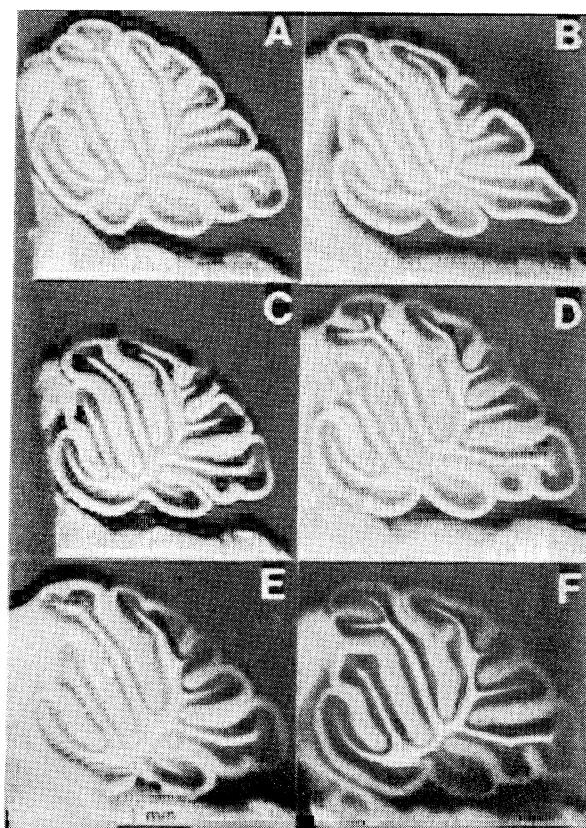


図7. 小脳の正中矢状断, A : 対照, B ~ F : それぞれ妊娠13日(B), 14日(C), 15日(D), 16日(E), 17日(F)にメチル水銀を投与された母親から産まれたマウス。小葉の分葉が種々の程度に減少している。

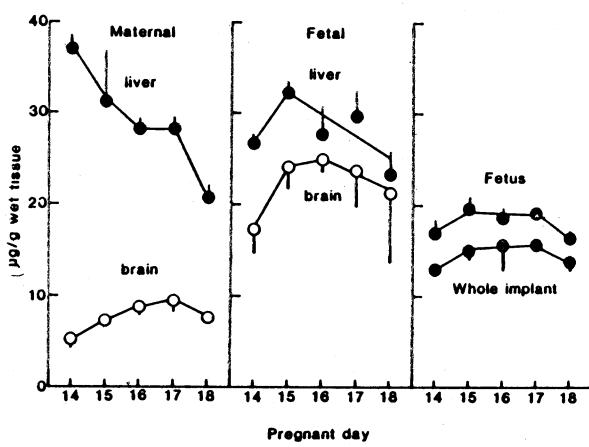


図8. 妊娠13日に20 mg/kgの塩化メチル水銀を経口投与した時の、母親および胎仔の総水銀量の変化。加熱、気化一金アマルガム法(スギヤマゲン水銀分析計)による。

なども含めて、様々な病理学的および生化学的な神経障害の結果として、今回観察された行動異常や、すでに報告されている、学習、探索行動、運動能力などの異常^{3, 16, 19, 21, 22}が引き起こされるものと推定される。

今回、妊娠13日から17日までのいずれの日にメチル水銀を投与した群も、出生仔の行動異常に著しい差はみられなかった。本実験よりさらに妊娠時期の早い、胎芽期にメチル水銀処理された出生仔でも同様の行動異常が出現すると報告されている^{21, 22}。そこで、妊娠13日に20 mg/kgを1回経口投与した母体と、胎仔について水銀分析をした結果(図8)，水銀は長期にわたって母体および胎仔の脳に留まることが判明した。したがって、たとえ胎芽期に投与されたメチル水銀も、直後に作用して脳および全身的な奇形を発現するのではなく、長期、母体および胎仔内に留まり、脳の発生がかなり進んでから障害を引きおこすものと考えられる。全妊娠期間を通じて水銀汚染魚介類を摂取していたと思われる母親から産まれた、胎児性水俣病患者の脳の障害も、脳の発生がかなり進んでから成立したと、武内^{23, 24}は推定しており、胎児が水銀に対する感受性を増すのは、発生がある程度進んでからのことと考えられる。この感受性の変化を発生学的に検討することは今後の重要な課題であろう。

本研究は、村尾光治、梶原裕二両研究員との共同研究である。標本作製にあたり、川端明子さんの協力に感謝する。

文 献

- 1) Amin-Zaki, L., S. Elhassani, M. A. Majeed, T. W. Clarkson, R. D. Doherty and M. Greenwood, *Pediatrics*, 54 : 587 - 595, 1975
- 2) Bartolome, J., W. L. Whitmore, F. J. Seidler and T. A. Slotkin, *Life Sci.*, 35 : 657 - 670, 1984
- 3) Bornhausen, M., H. R. Müsch and H. Greim, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 56 : 305 - 310, 1980
- 4) Chang, L. W., and K. R. Reuhl, *Environ. Res.*, 13 : 171 - 185, 1977
- 5) Chang, L. W., K. R. Reuhl and G. W. Lee, *Environ. Res.*, 14 : 414 - 423, 1977
- 6) Chusid, J. G., *Correlative Neuroanatomy*

- & Functional Neurology, Lange Med. Publicat., 1979
- 7) Falconer, D. S., J. Genet., 50 : 192 - 201, 1951
 - 8) Fuyuta, M., T. Fujimoto and S. Hirata, Teratology, 18 : 353 - 366, 1978
 - 9) Fuyuta, M., T. Fujimoto and E. Kiyofuji, Acta anat., 104 : 356 - 362, 1979
 - 10) Harada, M., Teratology, 18 : 285 - 288, 1978
 - 11) Inouye, M. and U. Murakami, Cong. Anom., 15 : 1 - 9, 1975
 - 12) Inouye, M. and S. Oda, J. Comp. Neurol., 190 : 357 - 362, 1980
 - 13) Kameyama, Y., J. Toxicol. Sci., 8 : 91 - 103, 1983
 - 14) Marsh, D. O., G. J. Myers, T. W. Clarkson, L. Amin-Zaki, S. Tikriti, M. A. Majeed and A. R. Dabbagh, Clin. Toxicol., 18 : 1311 - 1318, 1981
 - 15) Matsumoto, H., G. Koya and T. Takeuchi, J. Neuropath. Exp. Neurol., 24 : 563 - 574, 1965
 - 16) Müsch, H. R., M. Bornhausen, H. Kriegel and H. Greim, Arch. Toxicol., 40 : 103 - 108, 1978
 - 17) Ohsawa, M., K. Fukuda and K. Kawai, Industrial Health, 19 : 219 - 221, 1981
 - 18) Reuhl, K. R. and L. W. Chang, Neurotoxicol., 1 : 21 - 55, 1979
 - 19) Shimai, S., H. Satoh and N. Yasuda, Industrial Health, 22 : 41 - 44, 1984
 - 20) Sidman, R. L., P. W. Lane and M. M. Dickie, Science, 137 : 610 - 612, 1962
 - 21) Spyker, J. M., S. B. Sparber and A. M. Goldberg, Science, 177 : 621 - 623, 1972
 - 22) Su, M., and G. T. Okita, Toxicol. Appl. Pharmacol., 38 : 195 - 205, 1976
 - 23) Takeuchi, T., Pathology of Minamata Disease, Kumamoto University, 1968, pp 142 - 228
 - 24) Takeuchi, T., Acta Pathol. Jpn. 32(Suppl. 1) : 73 - 99, 1982
 - 25) Yang, M. G., K. S. Crawford, J. D. Garcia, J. H. C. Wang and K. Y. Lei, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 141 : 1004 - 1007, 1972

6. 無機水銀直接定量法とラット胎仔、新生仔におけるメチル水銀無機化反応の欠如

熊本市保健衛生研究所

小西 鉄朗

有機水銀化合物の生態内動態の解明や毒性の評価には、生物試料中無機水銀の正確な定量が不可欠である。従来、生物試料中の無機水銀量は総水銀と有機水銀の差や、Magos の方法、Isotope 交換反応等により求められているが、正確性、定量操作の容易性の点で難点がある。我々はあらたに生物試料中無機水銀の直接定量法を開発し、この方法を用いることにより生体内で微量に起こるメチル水銀無機化反応の研究が可能となった。ここに新定量法の概要と、この方法を用いて検討したラット胎仔、新生仔におけるメチル水銀の無機化について述べる。

生物試料中無機水銀の直接定量法

この方法はアルカリ性での過酸化水素が、共存する有機水銀を分解することなしに無機水銀を有機物質から遊離し、同時に還元し得る性質を利用したものである。

定量操作：100 ng 以下の無機水銀を含むホモジナイズした試料を反応容器（200 mL の短首ケルダールフラスコ）にとり、40% NaOH 溶液 10 mL

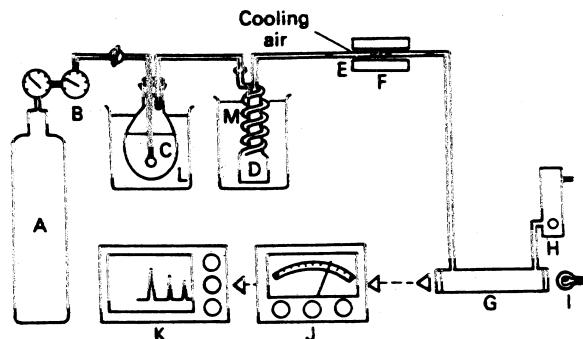


Fig. 1. Apparatus for the determination of mercury by electrothermal atomic-absorption spectrometry following gold amalgamation. (A) Carrier gas, N₂; (B) regulator; (C) reaction flask; (D) cooling tube; (E) gold trap; (F) furnace; (G) absorption cell; (H) flow meter; (I) mercury lamp; (J) detector; (K) recorder; and (L, M) cold water.

と 0.5% KCN 溶液 1 mL を加え、5 分間放置する。蒸留水で約 30 mL に希釈したのち沸とう水浴上で 3 分間加熱し、室温まで放冷する。蒸留水で全量を約 90 mL とし、0.5% MnSO₄ 溶液 1 mL、1% 酵母エキス溶液 5 mL、シリコン消泡剤 1 滴を加え、30% H₂O₂ 溶液 15 mL を注意して加えたのち、装置（図 1）に接続する。ポンベより窒素ガスを 1 L/min の速度で 30 分間装置内に流す。試料中の無機水銀はこれらの操作ですべて金捕集剤に移る。その後金捕集剤を 700 °C に加熱し、再気化した水銀蒸気を測定セルに導き、253.7 nm の波長で吸収を測定する。検量線は 100 ng 以下の無機水銀標準溶液を用い、水浴上での加熱操作を省いた同様の操作により作成する。

H₂O₂ による水銀の還元はきわめて緩徐な反応である。Sn²⁺による水銀の還元が 3 分以内に完

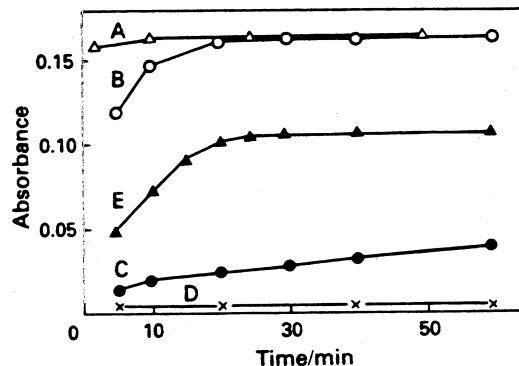


Fig. 2. Effects of the yeast extract on the time course of mercury volatilisation from various mercury solutions. (A) 40 ng of inorganic mercury, SnCl₄; (B) 40 ng of inorganic mercury, H₂O₂; (C) 40 ng of inorganic mercury, H₂O₂, without yeast extract; (D) 40 ng of organic mercury (methylmercury chloride, ethylmercury chloride or phenylmercury acetate), H₂O₂; and (E) actual specimen, 25 ng of inorganic mercury and 0.1 g of liver homogenate, H₂O₂. Each point represents separate analysis of inorganic mercury alone.

Table 1 Recovery of inorganic mercury from biological samples

Biological sample	Inorganic mercury present/ng		Mercury added/ng	Mercury found/ng	Recovery, %
Brain (0.5 g)	..	6	(HgCl ₂)	50	54
Liver (0.5 g)	..	13	(HgCl ₂)	30	43
Kidney (0.5 g)	..	49	(HgCl ₂)	30	80
Blood (1 ml)	..	4	(HgCl ₂)	50	52
Fish meat (0.5 g)	..	10	(HgCl ₂)	50	56
Liver (0.5 g)	..	13	(HgS)	50	60
		13	(MMC*)	1000	18
		13	(EMC†)	1000	18
		13	(PMA‡)	1000	17

* Methylmercury chloride.

† Ethylmercury chloride.

‡ Phenylmercury acetate.

Table 2 Comparison of mercury values in rat tissue determined by the proposed method and combustion method

Sample*	Mercury found \pm s.d./ $\mu\text{g g}^{-1}$	
	Proposed method (inorganic mercury)	Combustion method (total mercury)
Liver ..	1.10 \pm 0.03 (8)†	1.13 \pm 0.08 (10)
Kidney ..	19.66 \pm 1.01 (8)	19.01 \pm 0.73 (10)

* A rat was intravenously injected with 0.25 μmol of HgCl₂ and killed 4 h later.

† Number of determinations indicated in parentheses.

Table 3 Relative amount of inorganic mercury in organs and faeces after injection of 1 μmol per rat of methylmercury chloride

Organ	Inorganic mercury, %*				
	Proposed method†		Norseth and Clarkson method ¹⁴ †		
	Second day	Tenth day	Second day	Tenth day	
Brain ..	2.5	3.4	0.4~4.0	0.4~4.0	
Liver ..	9.5	21.4	12	27	
Kidney ..	11.6	36.4	20	41	
Faeces ..	48.8	51.4	53	51	

* Values are the means of determinations on three rats.

† Rats weighing 180 g were used in both of the experiments.

了するのに比べ (A), H₂O₂ では 3 時間の反応でも約半分の還元でしかない (C) (図 2)。

H₂O₂による水銀還元反応促進剤として酵母エキスを添加することと徐々に生成する水銀蒸気を金アマルガムとして捕集する操作がこの定量法を成立させた。酵母エキスの添加は標準液での水銀の還元時間を約20分に (B), 生物試料中の水銀の還元時間を25分に (E) 短縮する。酵母エキスの促進作用は主として含まれているグルタチオンによるものと考えられるが、その作用機序は明らかでない。このほかMnSO₄の添加は H₂O₂ の作用を一定にし、KCNは生物試料中に含まれるグルコースのような還元糖による有機水銀の分解を防ぐ役割をもっている。定量操作において有機水銀からの水銀の検出はほとんど認められなかつた (D)。

本定量法の特徴は H₂O₂ の酸化作用による有機物質からの水銀の遊離化と、還元化した水銀のアマルガム化捕集により、試料中に含まれるすべての無機水銀の回収が可能であることであり、このことによって検量線による測定が適用できる。また定量法には金アマルガム濃縮の利点がすべて生かされており、検出感度がきわめて高く (検出限界 1 ng), 再現性が良く (変動係数 2.7 ~ 2.8 %), 妨害物質の影響が少ない (無機水銀量の 2,000 倍以上の I⁻, B⁻ のみ影響する)。

生物試料に添加した水銀の回収率は塩化第二水銀で92%~103%であり、通常の還元化法では測定困難な難解離性の水銀塩、硫化水銀も高い回収率であった (表 1)。

一方、有機水銀では 0.5 %以下の無機水銀が検出されたが、これは定量操作における有機水銀の

Table 4 Total and inorganic mercury in tissues of mouse injected with mercuric chloride and sodium selenite

	Sample*	Inorg.-Hg(μg/g)†	Total-Hg(μg/g)†
Blood	...	1.64	1.60
Liver	...	1.91	1.88
Kidney	...	7.91	7.88
Spleen	...	2.08	2.32

* A mouse was subcutaneously injected with 0.5 μmole of HgCl₂ and 1 μmole of Na₂SeO₃, and killed 24h later.

† The values were the means of three determinations.

Table 5 Distribution of total mercury in pregnant rats administered methylmercury chloride

Tissues	Total-Hg(μg/g)	Inorg.-Hg(μg/g)	Inorg.-Hg(%)
Blood	11.85	0.17	1.40
Brain	1.26	0.02	1.51
Liver	4.15	0.47	11.32
Kidney	16.39	3.22	19.65
Placenta	3.82	0.13	3.04

Pregnant rats received a single intravenous injection of methylmercury chloride, 5 μmoles, on the 15th day of gestation. Five days after injection, total and inorganic mercury were measured in maternal tissues. The values were means of two rats.

Table 6 Fetal distribution of total and inorganic mercury in rats administered methylmercury chloride

Tissues	Total-Hg		Inorg.-Hg		Inorg.-Hg (%)
	μg/g	ratio to placenta	μg/g	ratio to placenta	
Whole body*	3.21 ± 0.37	0.81	0.10 ± 0.02	0.83	3.09
Blood	14.84	3.88	0.14	1.17	0.94
Brain	2.31	0.60	0.02	0.17	0.86
Liver	5.13	1.34	0.08	0.67	1.56
Kidney	2.78	0.72	0.08	0.67	2.88
Placenta	3.82	1.00	0.12	1.00	3.04

* The values were mean ± S.D. of seven fetuses.

Table 7 Fetal and maternal distribution of mercury in pregnant rats administered mercuric chloride

Tissues	Inorg.-Hg	
	Maternal rat(μg/g)	Fetus(μg/g)
Whole body*		0.08 ± 0.01
Blood	0.33	0.01
Brain	0.10	0.03
Liver	0.81	0.02
Kidney	65.57	0.02
Placenta	1.13	

* The value was mean ± S.D. of six fetuses.

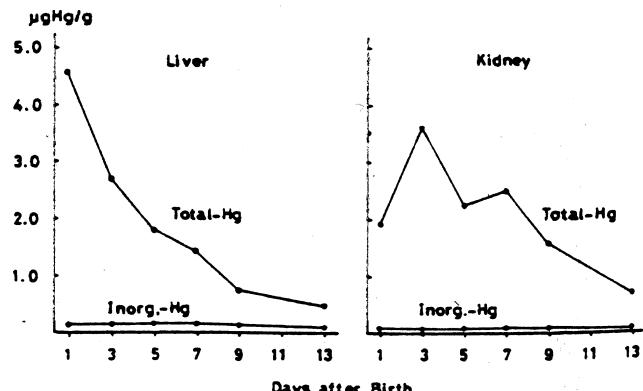


Fig.3 Time course of total and inorganic mercury in the liver and kidney of newborn rats.
The values are means of two or three rats.

分解によるものではなく、不純物として含まれていた無機水銀が検出されたものと考えられる。塩化第二水銀をラットに投与し、水銀として無機水銀のみを含む試料について測定した無機水銀の値と、石英管燃焼金アマルガム法で測定した総水銀の値とを比較すると、両者の値は非常に良く一致した（表2）。また、Norsethらが Isotopeの交換反応を用いて測定したメチル水銀投与ラットの無機水銀の比率と、同様の処置を行なったラット

について測定した本法による比率は、比較的良好な一致をみている（表3）。Magos の方法では、塩化第二水銀とセレンを同時に投与した生物試料について、無機水銀の回収率が下がることが報告されているが、本法での回収率は高く、この現象はみられなかった。以上のように本法は、感度、精度とも高く、試料中すべての無機水銀の測定が可能であり、また操作中での有機水銀の分解がほとんど起らない定量法である。

ラット胎仔，新生仔におけるメチル水銀無機化

上記定量法を用いて，無菌的で薬物代謝酵素系未発達であるラット胎仔および新生仔でのメチル水銀無機化を検討した。

妊娠15日目のラットに $5 \mu\text{mole}$ の塩化メチル水銀を静注し，5日後に測定した母体および胎仔内の水銀濃度を表5・6に示した。妊娠ラットに投与したメチル水銀は，すみやかに胎盤をとおって胎仔に移行し，胎仔中の総水銀は脳・肝臓・血液で母体より高い値を示した。投与5日後の胎仔中無機水銀濃度は，各臓器で極めて低く，全胎仔として $0.1 \mu\text{g/g}$ ，総水銀に対する無機水銀の比率は3.1%以下であった。胎盤中の無機水銀の比率が全胎児のものと変わらないことから，検出された微量の無機水銀は，母体で無機化された一部が胎盤バリアーを通じて移行したものではないかと考えられた。このため無機水銀の胎仔移行について検討した。

母ラットに投与したメチル水銀の20%が5日間に無機化されると推定し，妊娠14日目のラットに $0.25 \mu\text{mole}$ の塩化第二水銀を4日間連続して静注し，5日目の母体および胎仔の水銀濃度を測定した（表7）。無機水銀の投与では，母体腎臓への蓄積が著しく，投与量の67%が含まれていた。胎

仔への移行は極めて少なく，全胎仔としての無機水銀値は $0.08 \mu\text{g/g}$ であり，この値はさきのメチル水銀投与胎仔に見出された値とよく類似していた。これらのことから，胎仔内ではメチル水銀の無機化はほとんど起こらないと考えられた。

妊娠19日目のラット $5 \mu\text{mole}$ の塩化メチル水銀を静注し，2日後に生まれた新生仔を経日的に殺して，新生仔内でのメチル水銀無機化を検討した（図3）。総水銀値は，新生仔が生後なお母乳からメチル水銀を摂取しているにもかかわらず，肝臓で直線的に減少した。腎臓では生後3日目に総水銀値が最も高くなり，以後減少した。これは生後腎臓機能が活性化し，水銀の蓄積が始まったものと思われる。一方，無機水銀の濃度は，生後13日間，肝臓，腎臓とも増加が認められなかった。特に，無機水銀の蓄積が起こるはずの腎臓で無機水銀の値が上昇しなかったことは，新生仔でも胎仔と同様にメチル水銀の無機化がほとんど起こらないと考えられる。これらの結果は，無菌成熟ラットでメチル水銀の無機化が比較的よく行なわれると対照的であり，メチル水銀の生体内無機化反応が動物の成育と共に発達する反応で，そのメカニズムがラットの胎仔や新生仔には欠けているか，あるいは未発達であることを示唆している。

7. 動物体体内でのメチル水銀 Biotransformation の抑制と促進

熊本大学医学部免疫研薬理学部門
須田 郁夫

ラット体内では投与したメチル水銀から無機水銀を生成する反応が存在している。このメチル水銀の無機化反応がいかなるメカニズムで行なわれているかについては我々を含めいくつかのグループが挑戦してきたが、明解な解答が得られないまま今日に至っている。我々はゆっくりとした無機化反応の起こる conventional ラットを用いている限りではこの機構解明は難しいと予想し, conventional ラットよりも無機化の促進しているラットおよび遅延しているラットを作成することによってその糸口をつかもうとした。そしてついにラット体内でのメチル水銀の無機化反応調節薬物, すなわち促進剤 (phenylhydrazine, PHZ), 遅延剤 (carrageenan, CAR) を発見したので、それらを投与したラットを用いてこの機構の解明を試みた。なお本研究において無機水銀量は小西らの開発した直接定量法で定量した。

結果および考察

メチル水銀投与 1 日後に PHZ を投与したラットではヘマトクリット値が低下し、脾腫大が生じた (Fig. 1)。この赤血球の崩壊に伴ない、脾・肝・腎への(総)水銀の移行が認められ、また血

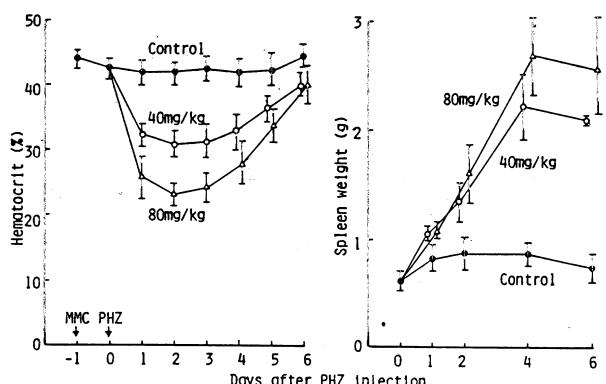


Fig. 1 Effect of phenylhydrazine on the peripheral hematocrit (%) and spleen weight.

液・脾・肝・腎では無機水銀(%)が対照群よりも明らかに増加した (Fig. 2)。無機水銀(%)の増加は無機水銀量の増加に依存していたので (Fig. 2), PHZ 投与ラットではメチル水銀の無機化が促進していることが明らかとなった。

脾の総水銀量および無機水銀量は PHZ 投与後の初期段階で共に顕著な増加を示したが (Fig. 2), これは投与したメチル水銀の大部分を結合している赤血球が PHZ の作用を受け、赤血球処理器官である脾に集まり、そこで速やかな分解を受けた

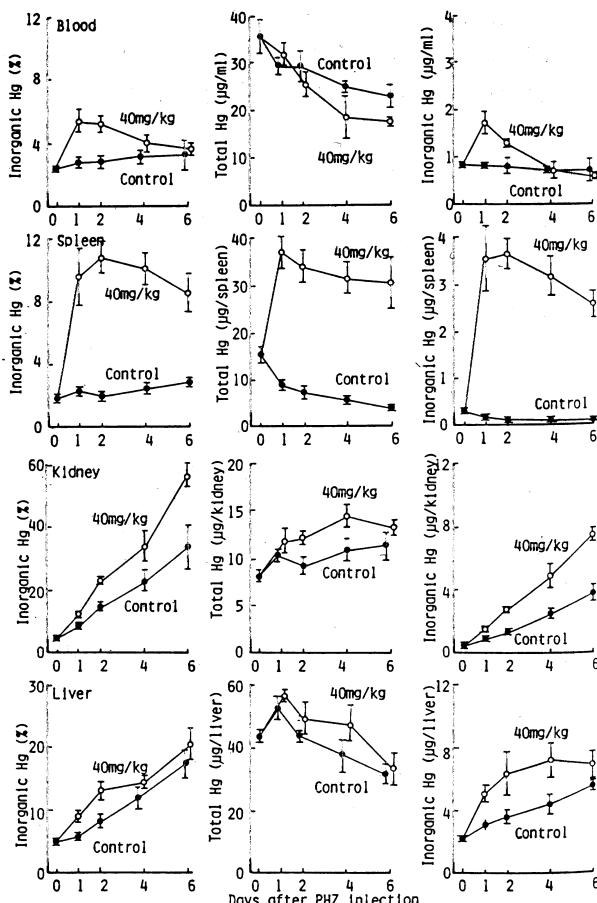


Fig. 2 Accelerated biotransformation of MMC in rats given PHZ.

ためと推察された。それゆえ脾は無機水銀生成の場として重要であろうと示唆された。このことは脾剔出ラットに無機化遅延（腎において）が起こっていることからも裏付けられた（Fig. 4）。

胆管結紮ラット、すなわち腸肝循環を断ち肝に負荷をかけたとしても無機化はほとんど影響されなかった（注：腎に無機水銀（%）の低下が認められるが、これは総水銀量の増加に伴う見かけ上の低下である。Fig. 5）。そのため肝は無機水銀生成の場としてはさほど重要でないと思われるが、肝にもその可能性が若干あることがFig. 3より示唆された。すなわちPHZ投与ラットにおいて無機水銀（%）（もしくは無機水銀量）はPHZ投与量が増加するに伴ない増加したが、この増加は脾では40mg/kg以下の低濃度域で、肝では60mg/kg以上の高濃度域で著明であった（Fig. 3）。このことは脾での処理能力がoverした場合には肝もその機能を一部担うことを意味した。さらに胆管結紮ラットは閉塞性黄疸を起こしていたことから、PHZ投与ラットにおける無機化の促進は黄疸による影響ではないことも判った。

機水銀を多量に蓄積する腎は從来無機水銀生

成の場の一つとして重要視されていた。しかし、無機化促進が起こっているPHZ投与ラット腎の無機水銀量には脾のようなPHZ投与後の初期段階での顕著な増加は認められず、日数の経過と共に徐々に増加した（Fig. 2）。またPHZ投与量が増しても無機水銀（%）は20mg/kg～100mg/kgでほぼ一定であった（Fig. 3）。さらに腎剔を行なっても無機化は全く影響されなかった（Fig. 6）。これらの結果から、腎での無機水銀生成の可能性は極めて低く、この臓器は単に無機水銀蓄積の場

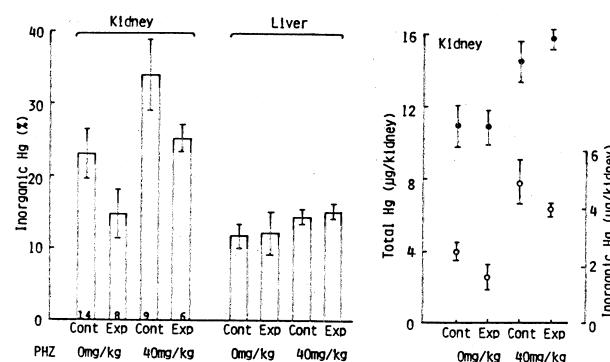


Fig. 4 Inorganic Hg found 5 days later after MMC injection in spienectomized rats.

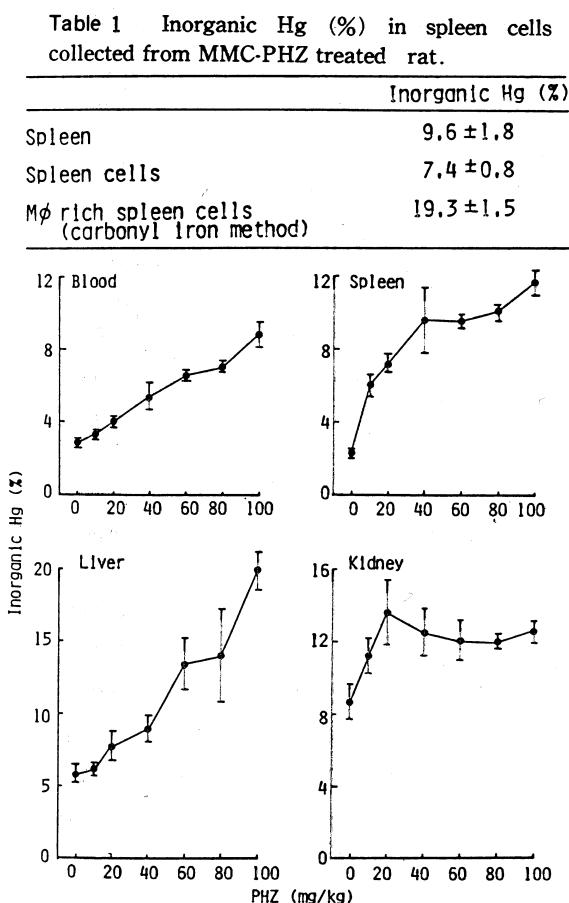


Fig. 3 Effect of PHZ on the biotransformation of MMC in rats. (1 day after PHZ injection)

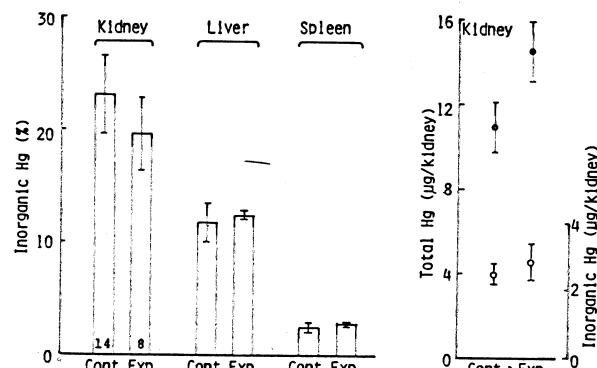


Fig. 5 Inorganic Hg found 5 days later after MMC injection in bile-duct ligated rats.

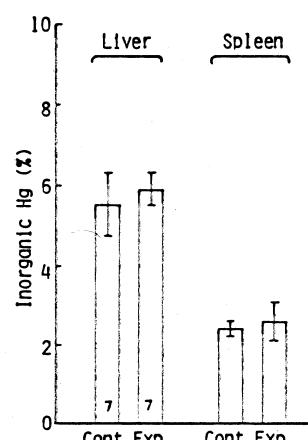


Fig. 6 Inorganic Hg found in 1.5 days after MMC injection in nephrectomized rats.

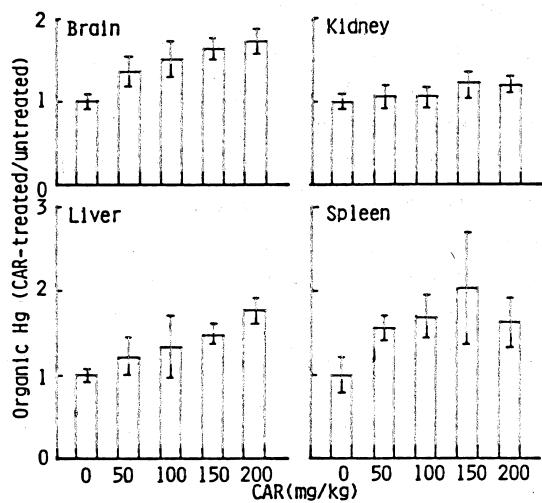


Fig. 7 The accumulation of organic Hg in brain, kidney, liver and spleen of carrageenan-treated rats.

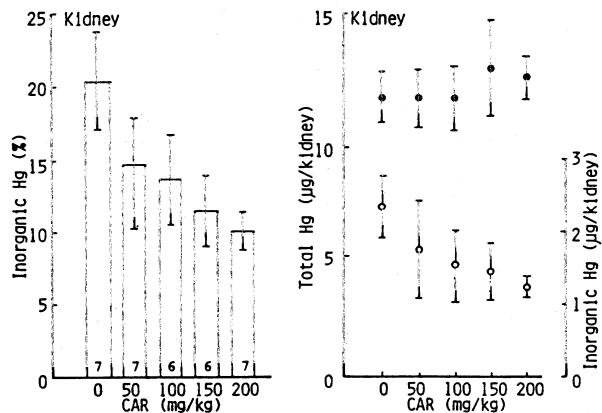


Fig. 8 Inhibited biotransformation of MMC in kidney of rats given carrageenan.

とみなす方が妥当と考えられた。

無機化促進の認められる PHZ 投与ラットの脾において無機水銀(%)の比は $M\phi$ rich 脾細胞 : 脾細胞 (分画前) = 2.6 : 1.0 であった (Table 1)。さらに $M\phi$ 中に toxic な薬剤である CAR を投与したラットでは無機化遅延により残存したメチル水銀が検出され (Fig. 7), しかも腎においては CAR 投与量に逆比例した無機水銀(%) (もしくは無機水銀量) の dose dependent な減少が認められた (Fig. 8)。これらの結果は $M\phi$ がこの無機化に重要な役割を果たしていることを示した。

メチル水銀の無機化はメチル水銀投与後 PHZ を投与した場合には著しく促進されるけれども、逆の投与順序では促進されなかった (Fig. 9)。またメチル水銀を含む赤血球を PHZ 处理したもの

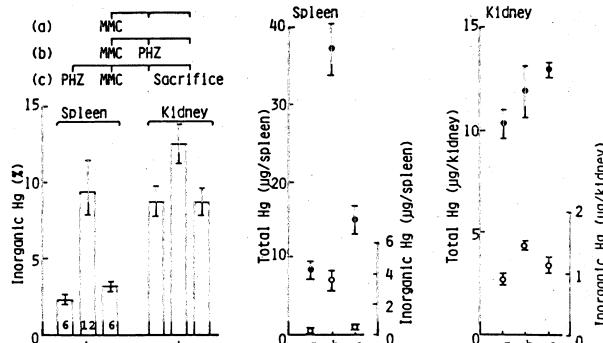


Fig. 9 Inorganic Hg found in spleen and Kidney of MMC-PHZ or PHZ-MMC treated rats.

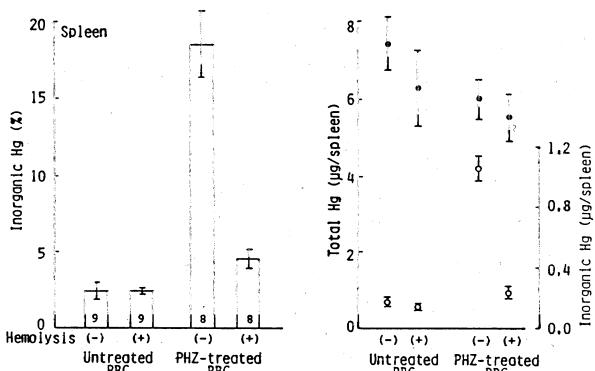


Fig. 10 Accelerated biotransformation of MMC after injection of unhemolyzed RBC treated with MMC and PHZ.

をラットに尾静脈投与した場合には無機化促進が起こるが非処理赤血球を投与した場合には起こらなかった (Fig. 10)。これらの結果から PHZ の作用を受けたメチル水銀結合赤血球が脾に集まり、急速に処理されることが無機化の促進に必要であろうと考えられた。さらに PHZ 処理赤血球の溶血液を投与しても無機化促進は認められなかつたが (Fig. 10), この原因はメチル水銀が溶血液から正常赤血球に移行したためであることが判った。

結論

1. PHZ 投与ラットではメチル水銀の無機化が促進している。
2. CAR 投与ラットではメチル水銀の無機化が遅延している。
3. 脾はメチル水銀の無機化の場として重要であり、肝にもその可能性がある。
4. この無機化はメチル水銀を結合した赤血球が脾で処理を受ける際に起こるらしい。
5. それには脾 $M\phi$ が重要な役割を果たすらしい。

8. メチル水銀の血中、胆汁中での動態と セレンによる生体内動態の修飾

北里大学薬学部公衆衛生学教室

永沼 章・井村 伸正

メチル水銀の体内動態についての研究はこれまでにも盛んに行われてきたが、現在までに得られている主要な知見はラットに関するものが大部分である。メチル水銀の体内分布や排泄などには動物種差や系統差のあることが明らかにされておりラットを用いた研究から得られた知見を他の動物種にそのまま適用すると大きな間違いを生ずる可能性もある。そこで我々は、各動物種に共通で基本的と考えられるメチル水銀代謝調節機構を明らかにするために、メチル水銀の体内動態の動物種差について検討をしている。

メチル水銀の血液内挙動

Fig. 1 に示すように、マウス、ラット、ラビットにメチル水銀を投与すると、ラットの血液中メチル水銀濃度は他の 2 種に比べて顕著に高い値を示す²⁾。これらの動物の赤血球中のメチル水銀の存在状態を調べたところ、ラットではこれまでの報告と同様に 98% 以上のメチル水銀がヘモグロ

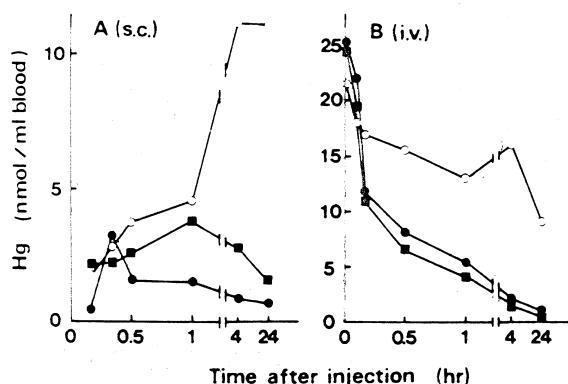


Fig. 1. Mercury concentrations in the blood samples collected at various times after sc (A) or iv (B) injection of $\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$. The values are the means of three animals for rats and mice, and of two for rabbits. (○) Rat, (●) mouse, (■) rabbit.

ビン画分中に存在したが、マウス、ラビットではヘモグロビン画分以外に、それぞれ 30%，60% が低分子量画分中に存在し¹⁾、この低分子量画分中のメチル水銀はグルタチオン (GSH) と結合していることが明らかとなった²⁾ (Fig. 2)。この現

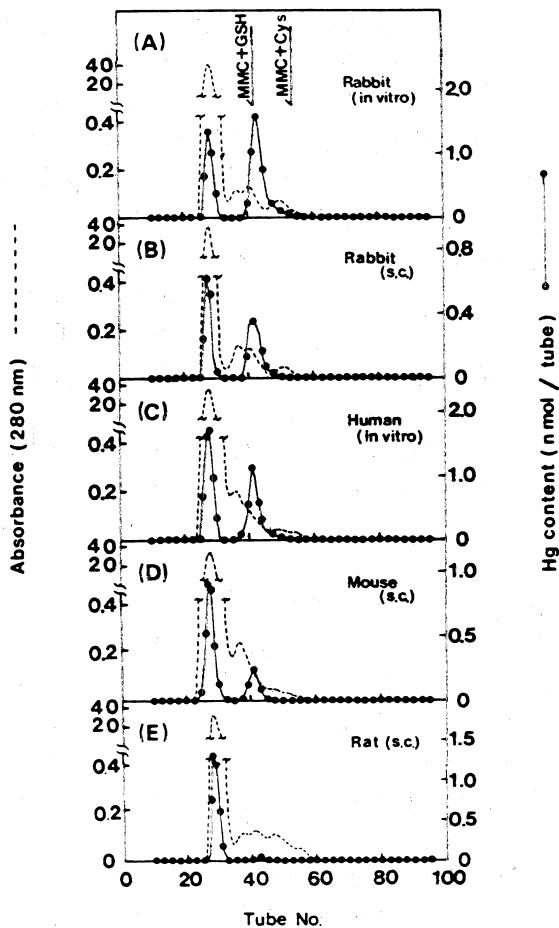


Fig. 2. Sephadex G-15 chromatography of stroma-free hemolysates obtained from rabbit blood (A) or human blood (C) added *in vitro* with $\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$, from rabbit (B), mouse (D), or rat (E) 30 min after sc injection of $\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$.

Table 1. Mercury excretion into the bile of rats, mice, rabbits and guinea pigs after i.v. administration of Me²⁰³HgCl

Bile flow (ml/100 g body weight/hr)	Time after injection (hr)					% dose	
	0-2	2-4	23-25	0-2	2-4		
	Concentration (nmole/ml)						
Rat	0.29 ± 0.06	2.33 ± 0.33	2.84 ± 0.86	3.08 ± 0.43	0.47 ± 0.11	0.61 ± 0.30	0.57 ± 0.14
Mouse	0.07 ± 0.03	0.72 ± 0.49	1.92 ± 0.66	1.73 ± 0.64	0.023 ± 0.013	0.091 ± 0.063	0.076 ± 0.021
Rabbit	0.28 ± 0.12	0.31 ± 0.09	0.31 ± 0.18	0.14 ± 0.08	0.049 ± 0.017	0.036 ± 0.012	0.019 ± 0.010
Guinea pig	0.59 ± 0.22	0.059 ± 0.006	0.054 ± 0.010	0.167 ± 0.038	0.024 ± 0.009	0.019 ± 0.007	0.069 ± 0.028

Values are average of four animals (mean ± S.D.).

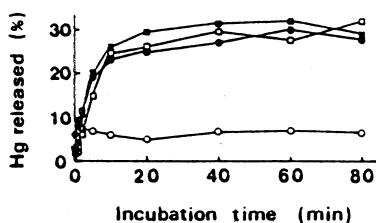


Fig. 3. Release of mercury from erythrocyte to BSA solution. (○) Rat, (□) human, (●) mouse, (■) rabbit.

象は in vivo, in vitro 共に認められ、さらにヒトの血液にメチル水銀を添加してもマウスやラビットと同様に赤血球中のメチル水銀の約 50% が GSH と結合した^{1, 2)}。in vitro でメチル水銀を予め取り込ませた赤血球中からの牛血清アルブミン (BSA) 溶液中へのメチル水銀の遊離率を検討したところ、ラット赤血球中からのメチル水銀の遊離率はマウス、ラビット、ヒト赤血球の場合に比べて著しく低く¹⁾ (Fig. 3)，赤血球中のメチル水銀 - GSH 形成がメチル水銀の赤血球中からの遊離に関係する可能性も考えられた。しかし、GSH を枯渇化させても、マウス赤血球中からのメチル水銀遊離率の低下は認められないことからメチル水銀 - GSH の形成のみでは、赤血球中からのメチル水銀遊離率の動物種による違いは説明できない。

またラットでは血液中のメチル水銀濃度がマウスやラビットに比べて高濃度に維持されるが、Fig. 1 の実験ではラット血液中のメチル水銀の 98% が赤血球中に存在し、マウス、ラビットはそれぞれ 84, 88% であり、この割合は in vitro でこれらの動物の血液にメチル水銀を添加しても同様なことから、ラット赤血球は、他の動物種に比べてメチル水銀を取り込み易く、出しにくいために赤血球中メチル水銀濃度が高くなるものと考えられる。

メチル水銀の胆汁中排泄³⁾

ラットを用いた実験結果から、メチル水銀は相当量が胆汁中に排泄され、その大部分が再び腸管

から吸収されるのでメチル水銀代謝においては腸肝循環が重要であるとされてきた。そこでメチル水銀の胆汁中排泄率をラット、マウス、ラビット、モルモットで比較したところ、ラットでは確かに相当量のメチル水銀が胆汁中に排泄されたが、他の 3 種の動物ではラットの $1/10$ 以下しか排泄されなかった (Table 1)。胆汁中でのメチル水銀の存在状態を調べたところ Fig. 4 に示すように、ラットではその大部分がこれまでの報告と同様にメチル水銀 - GSH として存在したが、マウスでは 40% しかグルタチオンと結合しておらず、ラビット、モルモットではほとんどのメチル水銀が高分子量画分に存在した。ラットの場合、メチル水銀

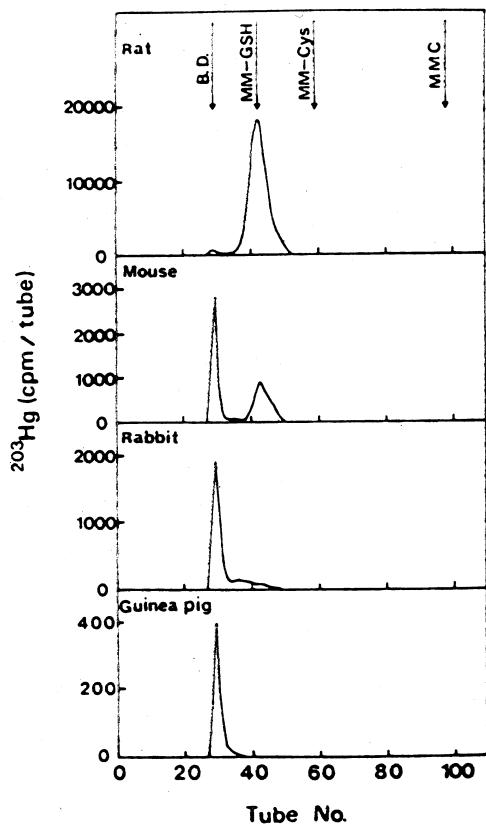


Fig. 4 Sephadex G-15 chromatography of bile from rats, mice, rabbits and guinea pigs 2-3 hr after i.v. administration of Me²⁰³HgCl (3 μ mole/kg). B.D., blue dextran; MM-GSH, methylmercury-glutathione; MM-Cys, methylmercury-cysteine; MMC, methylmercuric chloride.

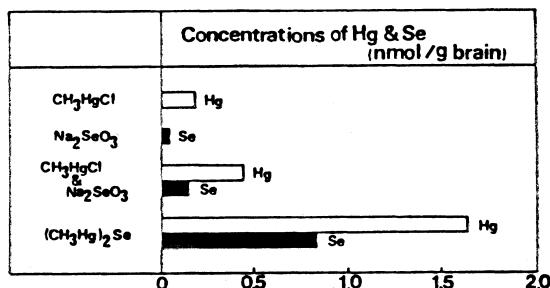


Fig. 5 Concentrations of mercury and selenium in the brain obtained from mouse 10min after the intravenous injection of $\text{CH}_3^{203}\text{HgCl}$ and/or $\text{Na}_2^{75}\text{SeO}_3$, or $(\text{CH}_3^{203}\text{Hg})_2^{75}\text{Se}$.

は GSH との複合体として胆汁中に排泄されると考えられている。ラビットの胆汁に *in vitro* でメチル水銀 - GSH を添加した後にゲルろ過すると、全てのメチル水銀が高分子量の画分に移動することから、ラビットの場合、メチル水銀がラットと同様に GSH との複合体として胆汁中に排泄されるとしても、直ちに胆汁中で高分子量の物質に再結合してしまうものと考えられる。ラット以外の動物でのメチル水銀の胆汁中排泄機構については現在詳細に検討を加えている。

メチル水銀の生体内動態のセレンによる修飾

セレン化合物がメチル水銀の毒性を軽減することが知られている。我々はメチル水銀の血液内動態に対するセレン（亜セレン酸）の影響を *in vitro* で検討したが、セレンはメチル水銀の血液内分布にほとんど影響を与えるなかった。しかし赤血球中にメチル水銀とセレンを取り込ませるとメチル水銀とセレンが共に中性の PH でベンゼンに可溶性となり、この現象がメチル水銀 2 分子とセレン 1 分子の複合体である bis (methylmercuric) Selenide [$(\text{CH}_3\text{Hg})_2\text{Se}$; BMS] の生成によるこを見いだした⁴⁾。メチル水銀とセレンを動物に同時に投与するとメチル水銀の脳中への蓄積量が増加することが知られているが、BMS の形で投与されたメチル水銀は、この場合よりもさらに

多く脳中に移行することから、セレン化合物によるメチル水銀の脳中蓄積増加現象がこの BMS の生成による可能性も考えられる⁵⁾ (Fig. 5)。しかし BMS の生成とセレンによるメチル水銀毒性軽減現象との関係は今のところ全く不明である。

メチル水銀の生体内動態とその調節機構は、まだほとんど明らかにされていないといつても過言ではない。我々の研究も現段階ではまだ現象をとらえたにすぎないが、動物種差およびセレンの効果などを詳細に検討し、そこで認められた重要な現象の発現機構と意義を解明することによってメチル水銀の代謝や毒性発現機構の解明に着実に近づけるものと考える。

文 献

- 1) A. Naganuma and N. Imura, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 47, 613, 1979.
- 2) A. Naganuma et al., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54, 405, 1980.
- 3) A. Naganuma and N. Imura, *Biochem. Pharmacol.*, 33, 679, 1984.
- 4) A. Naganuma and N. Imura, *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 27, 163, 1980.
- 5) A. Naganuma et al., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, 30, 301, 1980.

9. 脳神経系における酵素及び蛋白合成系に対するメチル水銀毒性

新潟大学理学部生体物理化学教室

小俣 三郎

蛋白合成系に対するメチル水銀の作用

メチル水銀による神経系の機能障害・形態変化が蛋白合成能の阻害に起因することを明らかにする目的で、Yoshino ら¹⁾以来多くの研究結果が報告されているが未だ不明の点が多く残されているのが現状である。我々も実験的にメチル水銀中毒症を発症させたラットを用いてこの問題に關して種々の角度から検討を加えて来たので以下にそれについて述べたい。

さて、蛋白合成能の指標としては *in vivo*, *in vitro* を問わず、ほとんどの場合に標識アミノ酸の蛋白へのとりこみ速度が用いられている。メチル水銀を投与したラット神経系の蛋白合成能について調べる場合、標識アミノ酸の蛋白への見かけ上のとりこみ速度に影響を与える因子としては、(1)蛋白合成装置そのものの活性変動、の他に(2)メチル水銀中毒症の進行に伴なう摂餌量低下による栄養障害、(3)標識アミノ酸の投与部位からの吸収速度、(4)標識アミノ酸の組織・細胞内へのとりこみ速度、(5)細胞内プール（アミノ酸濃度と代謝）、等があげられ、メチル水銀による蛋白合成装置の真の活性変動を検討する場合に考慮しなければならないものである。

A. 栄養障害の影響 我々は *kle in*²⁾ の方法 (10 mg 塩化メチル水銀 / kg 体重 / 日, 7 日間) にもとづきメチル水銀中毒発症に至る過程のラットについて検討を行なっている。投与後の各時期のラット脳をとりだしそのミトコンドリア上清における¹⁴C-ロイシンの蛋白へのとりこみ速度を測定すると図1³⁾に示すようにメチル水銀中毒の初期過程 (~5 日) では大きな変動は見られないが、潜在期 (9 - 11 日) では低下をはじめ、典型的な後肢交叉等を示すようになる発症期 (~14 - 15 日) では対照の50%台にまで達している。一方、図示し

てないが、肝では初期には蛋白合成能の大きな上昇が見られ、潜在期、発症期には低下していた。メチル水銀処理ラットの体重は初期ではむしろ対照より高めであるが、潜在期前から減少をはじめ発症期には投与開始時の70%程度にまで低下する³⁾。これは食餌摂取量の減少によるものが大きい。そこで正常ラットに対して食餌量を制限して、メチル水銀投与ラットと同じ体重減少曲線を示す条件にした上で脳、肝の蛋白合成活性を測定した。表1⁴⁾にみられるように、食餌制限ラット肝では有意の低下が認められたが脳では影響が認められなかった。従ってメチル水銀投与により肝で見られた蛋白合成能の低下は主として動物の栄養障害によるものであり、脳におけるそれは栄養障害による二次的なものでなくメチル水銀の直接作用によるものであると結論できる。

B. 前駆体プールの問題—脳 はじめにあげた標識アミノ酸の見かけ上のとりこみに影響を与える因子のうち(3), (4)は終局的には(5)に反映される。多くの研究者はこの細胞内前駆体プールの変動を

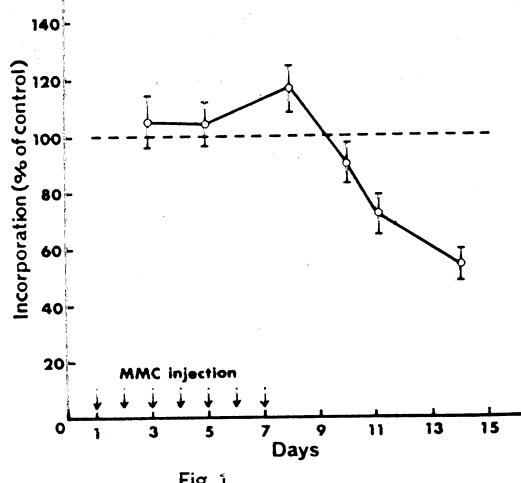


Table 1 Effects of food restriction on the cell-free ^{14}C Leucine incorporation in the rat brain and liver

Duration ^c	Body weight (percentage of initial) ^d	$[^{14}\text{C}]$ Leucine incorporation ^b					
		Brain			Liver		
		Control	FR ^e	Percentage of control	Control	FR	Percent- age of control
4	84.3 ± 0.49 ^f	188 ± 15.6	177 ± 13.5	94.1	596 ± 32.9	685 ± 105	115
6	76.7 ± 2.37	211 ± 10.6	220 ± 29.6	104	680 ± 173	546 ± 120	72.7
7	75.3 ± 2.86	172 ± 15.0	160 ± 2.29	93.6	498 ± 63.5	264 ± 15.6	53.0 ^g

^a The food-restricted rats were given 6 g of diet/day/rat on Day 4 and thereafter (see Fig. 1).

^b Counts per minute per 100 μl of postmitochondrial supernatant (PMS) for brain and 50 μl of PMS for liver.

^c Duration of food restriction in days.

^d Initial means the onset of food restriction.

^e Food-restricted rats.

^f Means ± SD of three to six rats.

^g $p < 0.05$, compared to control values.

無視するか、或いは酸可溶性画分の放射活性の変動を用いて補正するに止っている。後者の場合でも細胞内に存在するアミノ酸による標識アミノ酸の希釈や細胞内代謝系による標識アミノ酸の他物質への転化に対する考慮が全く不充分である。そこで我々は Dunlop ら⁵⁾, Reith ら⁶⁾によって開発された低比活性の ^{14}C -バリン大量注射法を適用して検討を行った。この方法は細胞内バリンプールを大きく拡大させることにより既存のバリン量の差や代謝による変動の影響を極小に止めることを目的にしており、更にこの大量バリン投与によっても蛋白合成能自体に変化が認められぬことが確認されている。この方法を対照及びメチル水銀投与ラットについて適用したところ [^{14}C] バリン投与後 1~2 時間では脳のバリンプールの濃度は正常ラットの 20~30 倍に上昇していた⁷⁾。更にこの時間範囲では大脳、小脳をはじめとする脳部域の遊離バリンの濃度および比放射活性は、対照、メチル水銀投与ラット共に変動は認められなかった。蛋白へとりこまれたバリンの比放射活性等を測定した後に、脳部域における蛋白合成速度を計算し、対照のそれと較べたものが表 2⁷⁾に示されている。小脳では潜伏期 (Day 10) から発症期 (Day 15) にかけて蛋白合成速度が低下しているのをはじめ、大脳皮質、視床下部、中脳等に大きな低下が認められた。この結果から、メチル水銀中毒の潜伏期から発症期に至る期間の蛋白合成活性の低下は、前駆体プールの変動によるものではなく、蛋白合成装置の真の活性低下によるものと結論できる。ただし図 1 と表 2 における阻害度の違いは、前駆体プールのメチル水銀による変動によるものと推定される。事実、脳部域のアミノ酸濃度を調べたところ初期から発症期にかけてアミ

Table 2 Inhibition of protein synthesis in regions of the brain of methylmercury-treated rats

	Protein synthesis (% of Control)	
	Day 10 ^h	Day 15 ^h
Pons, medulla oblongata	85.0	98.4
Hypothalamus	71.6	77.1
Striatum	81.0	82.9
Midbrain	76.4	80.3
Hippocampus	74.7	85.7
Cerebellum	81.1	72.4
Cerebral cortex	68.4	84.9
Spinal cord	89.0	94.0

^h Number of day after onset of sc injection of MMC, 10 mg/kg/day for 7 days.

ノ酸種に特異的な変動が認められ、ロイシン濃度は大脳皮質において発症期では 20~30 % 増加を示していた⁸⁾。

C. 前駆体プールの問題—末梢神経組織 上と同様な方法を末梢神経系の蛋白合成能の検討に適用した。ただし、末梢神経系では組織量が少く遊離アミノ酸濃度の測定が困難であるので [$I-^{14}\text{C}$] バリンを含む低比活性バリンを大量注射して、バリンが他のアミノ酸へ転化するために生ずる問題を無視できる条件下で行った。表 3⁹⁾に結果を示すが、後根神経節における初期からの顕著な低下が注目される。前根では軽度の阻害が認められるが、後根、座骨神経では逆に発症期において活性上昇が認められた。後根神経節における蛋白合成能の低下は、ラットではこの組織をはじめとする末梢神経系の蛋白合成に関与する細胞内構造体のメチル水銀による変化が著しいとする多くの研究

Table 3

Tissues	Specific activity (dpm/mg protein)*			
	Control	Day 5 ^b	Day 10	Day 15
Ventral roots	45.5 [45.3, 45.6] (100)	37.3 [35.1, 39.5] (82)	35.7 [40.8, 30.5] (78)	33.4 [36.6, 30.2] (73)
Dorsal roots	46.0 [46.4, 45.6] (100)	38.9 [39.4, 40.4] (87)	50.3 [50.4, 50.2] (109)	71.6 [80.7, 62.4] (156)
Dorsal root ganglia	244 [231, 257] (100)	145 [146, 143] (59)	147 [148, 145] (60)	131 [134, 128] (54)
Sciatic nerves	37.4 [35.0, 39.7] (100)	36.5 [36.0, 36.9] (98)	42.5 [47.9, 37.0] (114)	58.3 [50.9, 55.6] (156)

* Rats were injected i.p. with 1.5 mmol valine containing 10 μ Ci [14 C]valine per 100 gr body weight 2 h before the sacrifice. Each value is the mean of two experiments shown in the square brackets. In each experiment, the tissues from two rats were pooled for the assay. Numbers in parentheses are % of control value.

^b Number of day after onset of daily s.c. injections of MMC (10 mg/kg/day) for 7 days

者の報告と密接に関わっているものと思われる。このように末梢神経系の前根、後根神経節でもメチル水銀による前駆体プールの変動に関わりがなく蛋白合成装置そのものの活性低下が起きていることが確認された。

メチル水銀による蛋白合成活性の阻害機構

上に述べたようにメチル水銀によって蛋白合成装置そのものの活性が阻害されることが確認された。次にメチル水銀の作用部位についての検討が必要になるが、これについては明確な結果は得られていない。

A. 細胞画分についての検討 対照ラット、メチル水銀処理ラットからそれぞれミクロソーム画分、サイトソル画分を調製し四つの組合せについて蛋白合成活性を測定したところメチル水銀処理ラットから得たミクロソーム、サイトソル両画分共に標識アミノ酸の蛋白へのとりこみの低下に関与していることが判明した⁸⁾。密度勾配遠心法によるポリリボソームパターンの分析ではメチル水銀処理ラット脳では対照との差は認められなかつたが、肝ではポリリボソームの崩壊が見られた¹⁰⁾。一方、正常ラット脳より調製したポリリボソーム画分に直接メチル水銀を加えても低濃度では影響を与えるなかつたが、サイトソル画分の存在下では顕著な崩壊が見られた。これはRNase阻害因子の不活性化によるものであるが、ポリリゾームに対するメチル水銀作用がin vivo, in vitroで大きく違う点が注目される。

B. メチル水銀の組織蓄積量とin vitro阻害濃度 正常ラット脳から得た無細胞蛋白合成系に直接にメチル水銀を加えた場合、蛋白合成活性を対照の50%に低下させるのに必要なメチル水銀量は蛋白1mg当たり約15 μ gであった¹¹⁾。1Aで述べた投与法で脳に蓄積するメチル水銀量は潜在期か

ら発症期では0.3-0.4 μ g/mg蛋白であった¹²⁾。つまり細胞内ではin vitroの場合よりもはるかに低い濃度のメチル水銀によって蛋白合成活性の低下がおきていることがわかる。これらの結果はメチル水銀による脳蛋白合成活性の低下がポリリボソーム上におけるペプチド鎖形式反応系に対するメチル水銀の直接作用ではなく、この反応系の調節機構や形式過程に位置する機構—例えばメッセンジャーRNAをはじめとする諸RNAの転写、修飾・加工、輸送の過程—の障害に由来することを示唆するものかも知れない。しかしこの推定は組織・細胞内でのメチル水銀の均一な分布を前提としているので、メチル水銀が細胞内で部分的により高い濃度で局在する場合には蛋白合成系に直接的に作用していることも考えられる。更に細胞内の微細な分子環境に密接に関与するものと思われるメチル水銀の拡散や輸送の特異性、局在性についての検討も必要であろう。

C. RNA合成系に対する影響 メチル水銀を投与したラット脳から細胞核を単離しRNAポリメラーゼ活性を測定したが、MgおよびMn依存性両酵素とともに微小な活性低下を示したにすぎなかつた¹⁰⁾。マグリア細胞核、神経細胞核にそれぞれ富んだ画分でも違いは認められなかつたがメチル水銀の蓄積量は後者の方が高かつた。メチル水銀を投与したラットの後根神経節をとり出し、in vitroで高濃度の低放射活性³H-ウリジン存在下でRNAへのとりこみ活性を調べたところ、発症期においてのみ有意の低下を認めた¹³⁾。したがつてメチル水銀中毒の初期から見られたこの組織における顕著な蛋白合成活性の低下はRNA合性能の低下に起因するものではないと思われる。

酵素活性に対するメチル水銀の作用

表4は我々および高橋らによる種々の酵素活性

に対するメチル水銀投与の影響についてまとめたものである¹⁴⁾。

B R ; 脳, C R ; 大脳, C L ; 小脳, V R ; 前根, D R ; 後根, D R G ; 後根神経節, S N ; 座骨神経, L ; 肝, B L ; 赤血球。

神經伝達物質代謝酵素では C A T, A C E の末梢における低下が顕著である。一般酵素では S D H, P K, G P X の活性低下が注目される。正常ラット組織から得た酵素標品の活性測定系に直接メチル水銀を加えた際に、50%阻害を示すメチル水銀の濃度（I C₅₀）と、その場合のメチル水銀と測定系中の蛋白との比（Hg/Protein）も表4に示してある。酵素種によって大きな違いがみられ；更に

水銀/蛋白の比は神經組織における平均蓄積比である1～2 nmol/mg蛋白をはるかに上まわるものが多いことが判る。in vitroでは比較的低濃度のメチル水銀によって阻害をうけるが、in vivoでは全く阻害をうけていない酵素は M A O (B R), G A D (C R, C L), H K (B R), S D H (B R), A T Pase (B R), 2',3'-CNP (C R, C L) 等があげられるがこれらの多くはいわゆる S H 酵素に属している。逆に A C E (末梢)のように in vitroでは高濃度のメチル水銀によってのみ阻害されるが in vivoでは容易に大きな阻害度を示すものもある。メチル水銀の in vitro 添加によって酵素活性が阻害されたとしてもそれはこの酵素

Table 4 Effect of methylmercury in vivo or in vitro on enzyme activities in rat tissues

Enzyme	Tissue	In vivo		In vitro	
		Dose	Change	I C ₅₀ (μM)	Hg/protein (n mol/mg)
Choline acetyltransferase	BR	10 mg/kg/day	(+)	35	60
	VR		(0)		
	DRG	x7, sc	(0)		
	SN		(- -)	88	160
Acetylcholinesterase	BR	10 mg/kg/day	(0)	1,060	220,000
	VR		(-)	1,400	47,000
	DR	x7, sc	(- -)	1,300	16,000
	DRG		(-)	780	51,000
	SN		(-)	1,000	11,000
Glutamic acid decarboxylase	CR	1 mg/rat	(0)	41.3	124
	CL	x7-x11, po	(0)		
	BR	10 mg/kg/day	(0)	240	48
Catechol-o-methyl transferase	CR	10 mg/kg/day	(-)		
	CL		(0)		
	L	x7, sc	(-)		
	BR		(0)	100	50
GABA-amino-transferase	BR	10 mg/kg/day	(0)	250	2.8
		x7, sc			
Monoamine oxidase	BR	10 mg/kg/day	(0)	54	1,600
	CL	x7, sc	(-)		
	L		(-)		
Tyrosine hydroxylase	BR	10 mg/kg/day	(+)		
		x7, sc			
Lactic dehydrogenase	BR	10 mg/kg/day	(0)	16,000	259,000
	L	x7, sc	(+ +)	7,000	156,000
Hexokinase	BR	10 mg/kg/day	(+)	5	52
	L	x7, sc	(+)		
Succinic dehydrogenase	BR	10 mg/kg/day	(- -)	3.7	160
		x7, sc			
Pyruvate kinase	BR	10 mg/kg/day	(-)	26	1,700
	L	x7, sc	(- -)	26	170
Na-K ATPase	BR	As above	(-)	5	
Neuron-specific enolase	BR	As above	(-)		
Glutathione peroxidase	BR	10 mg/kg/day	(-)		
	L	x7, sc	(- -)		
	BL		(-)		
Superoxide dismutase	BR	10 mg/kg/day	(-)		
	L	x7, sc	(-)		
2',3'-Cyclic nucleotide phosphohydrolyase	CR	1 mg/rat	(0)	1.6	4.8
	CL	x7-x11, po	(0)		
	BR	10 mg/kg/day	(0)		
RNA polymerase	BR	10 mg/kg/day	(0)		
	RNA polymerase I, II	BR		1.0	

が *in vivo* において阻害され得る可能性を示すに過ぎない。以上の結果は細胞内におけるメチル水銀の動態が単純な拡散やSH基への一様な結合に止まらない複雑なものであることを示すと共に、蛋白合成能の阻害による酵素分子の減少が選択的におきている可能性も示唆している。

おわりに

メチル水銀による見かけ上の蛋白合成活性の阻害が、蛋白合成装置の活性そのものの阻害であることが明らかにされた。また酵素活性に対するメチル水銀の *in vivo* における作用も単純なものではなく、いわゆる SH酵素であっても全く阻害をうけない例も見出された。今後の課題としては以下の三点が主要なものとしてあげられよう。(1)メチル水銀による蛋白合成活性の量的低下は確認されたが、全ての蛋白種の合成活性が一様に低下しているのであろうか。現在我々の行っている研究から脳、後根神経節ではメチル水銀による蛋白種ごとの合成活性が異なることを示唆する実験結果が得られているのでこの点について追求していきたいと考えている。(2)、(1)と関連して特定の蛋白の合成活性低下がメチル水銀中毒症発症に関与しているのか否かについても確認すべきであろう。(3)メチル水銀の酵素に対する作用は細胞内において酵素分子がおかれている環境に大きく依存している。機能蛋白のSH基がメチル水銀の標的である可能性は当然大きいと言えるが、細胞内外におけるメチル水銀の動態をはっきりとつかんだ上での研究が必要であろう。

文 献

- 1) Y. Yoshino, T. Mozai, and K. Nakao: *J. Neurochem.* 13, 1223-1230 (1966).
- 2) R. Klein, S.P. Herman, P.E. Brubaker,

- G.W. Lucier, and M.R. Krigman: *Arch. Pathol.* 93, 408-418 (1972).
- 3) S. Omata, K. Sakimura, H. Tsubaki, and H. Sugano: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44, 367-378 (1978).
- 4) S. Omata, K. Sakimura, H. Tsubaki, and H. Sugano: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 44, 367-378 (1978).
- 5) D.S. Dunlop, W.V. Elden, and A. Lajtha: *J. Neurochem.* 24, 337-344 (1975).
- 6) M.E.A. Reith, P. Schotman, and W.H. Gipsen: *J. Neurochem.* 30, 587-594 (1978).
- 7) S. Omata, T. Horigome, Y. Momose, M. Kambayashi, M. Mochizuki, and H. Sugano: *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 56, 207-25 (1980).
- 8) 菅野浩、小俣三郎、堀米恒好、望月光由: 水俣病に関する総合的研究。37-40 (1980).
- 9) S. Omata, Y. Momose, H. Ueki, and H. Sugano: *Arch. Toxicol.* 49, 203-214 (1982).
- 10) 崎村建司、佐藤充、小俣三郎、菅野浩: 生化学。48, 748 (1976).
- 11) H. Sugano, S. Omata, and H. Tsubaki: Studies on the health effects of alkylmercury in Japan, Environment Agency of Japan (1975) 129-136.
- 12) 小俣三郎、菅野浩: 環境汚染へのとりくみ 山県登他編. 恒星社厚生閣 256-270 (1983)
- 13) S. Nagumo, S. Omata, and H. Sugano: *Arch. Toxicol.* (1984) in press.
- 14) S. Omata and H. Sugano: Recent Advances in Minamata Disease Studies, T. Tsubaki and H. Takahashi, (Eds.), Environment Agency of Japan, (1984) in press.

10. 培養神経系細胞でのメチル水銀毒性の研究

和光大学経済学部環境科学教室

三浦 郷子

北理大学薬学部公衆衛生学教室

中田 進・井村 伸正

水銀化合物の生体に対する影響を研究するにあたり、我々は、全動物に比べて、より単純な系として培養細胞を使用した細胞レベルの実験を行って来た。細胞は、継代培養細胞として mouse glioma (SR-CDF₁ DBT) と mouse neuroblastoma (C-1300, N-18 clone) を、初代培養細胞として鶏胚脊髄後根神経節細胞を用いた。

両継代培養細胞の増殖に対するメチル水銀化合物 (CH_3HgCl) の影響を検討した結果、細胞 ($0.5 \sim 1.0 \times 10^6 \text{ cells}/2\text{ml}$ 培地) の DNA 合成、RNA 合成等の高分子合成活性の抑制濃度 ($2 \sim 5 \times 10^{-5} \text{ M}$) より低い濃度 ($5 \times 10^{-6} \text{ M}$) のメチル水銀で細胞増殖が抑制されることを見出した。またこれらの増殖抑制が細胞分裂装置の構成成分である微小管の破壊あるいは、重合阻害の結果であることが電顕観察により明らかになり、メチル水銀の細胞内標的として微小管が浮び上って来た。分裂が抑制された細胞の詳細な電顕観察の結果、それらの細胞において、微小管は完全に消失しているが、他の細胞内オルガネラに顕著な変化が認められないこと、及び M 期の細胞が蓄積して来るというように細胞周期の中で、M 期から G₁ 期への移行が特異的に阻害されることからメチル水銀の微小管に対する作用が、きわめて特異的であることが強く示唆された^{1, 2)}。これらの結果に基づき微小管に対するメチル水銀の作用は、メチル水銀特有のものであるかどうかを検討するため、微小管蛋白質に対する直接作用、培地に添加した場合の細胞内微小管に対する作用、及び細胞内へ microinjection により注入した場合の作用を、他の多くの重金属化合物と比較検討することにした。

微小管蛋白質に対する直接作用は、豚の脳より抽出したチュブリンの *in vitro* 重合系 (2mg チュブリン/ ml を使用) を用いて検討した。5 種類の水銀化合物について、*in vitro* チュブリン重合抑

制効果を比較した結果、無機水銀が最も強い阻害作用を示し、以下 PCMPS, CH_3Hg^+ , $\text{C}_2\text{H}_5\text{Hg}^+$, PCMB の順に抑制効果が小さくなつた (Fig. 1) がいずれも、 $2 \times 10^{-5} \text{ M} \sim 10^{-4} \text{ M}$ の間に完全抑制濃度があり、SH 試薬である NEM と

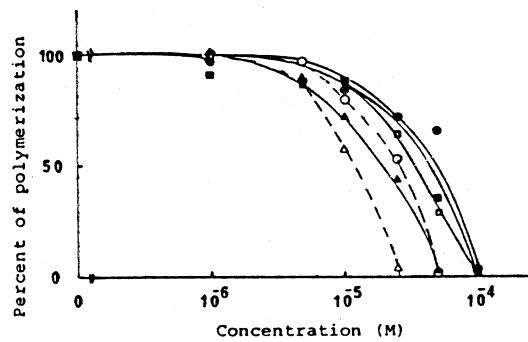


Fig. 1 Effect of mercurials on *in vitro* tubulin polymerization

● : pCMB, ▲ : pCMPS, ■ : NEM, ○ : CH_3HgCl
△ : HgCl_2 , □ : $\text{C}_2\text{H}_5\text{HgCl}$

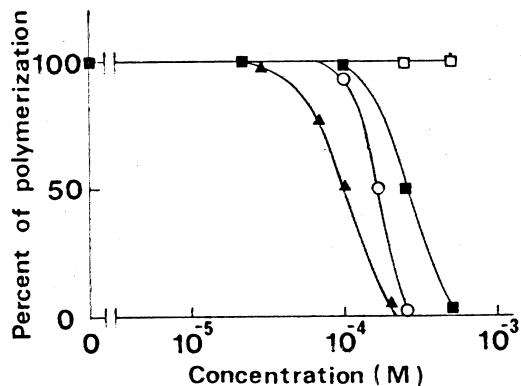


Fig. 2 Effects of Cd^{2+} , Cu^{2+} , Cr^{3+} , or Zn^{2+} on *in vitro* tubulin polymerization. Reaction mixtures were preincubated with Cd^{2+} (■), Cu^{2+} (○), Cr^{3+} (▲), or Zn^{2+} (□) for 10 min at 0°C , and the polymerization was monitored by viscosity (Cd^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+}) or turbidity (Cr^{3+}). The relative values of the final increase of viscosity or turbidity of the reaction mixtures are plotted against the concentration of chemicals added.

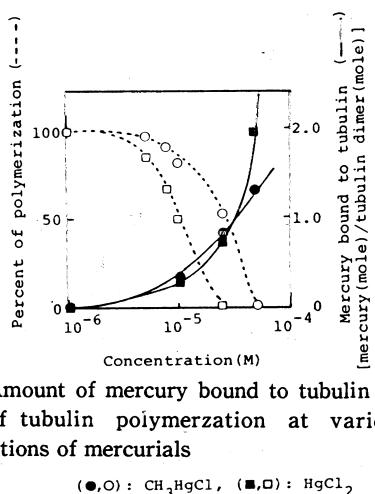


Fig. 3 Amount of mercury bound to tubulin and extent of tubulin polymerization at various concentrations of mercurials

(●,○) : CH_3HgCl , (■,□) : HgCl_2

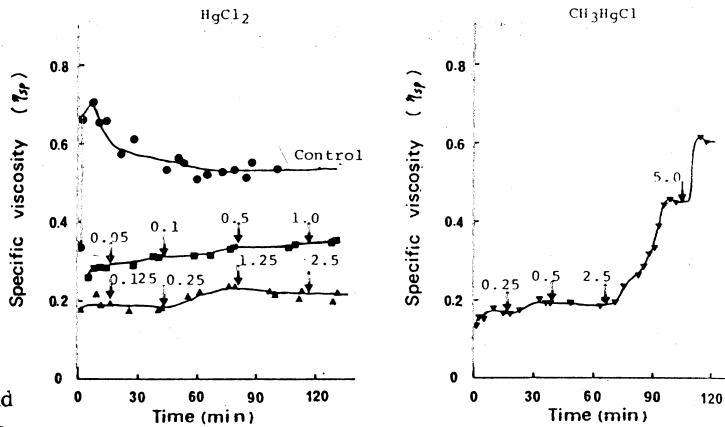


Fig. 4 Restoration of polymerizability by addition of 2-mercaptoethanol

Samples were treated with 10^{-5} M HgCl_2 (■), $2.5 \times 10^{-5}\text{ M}$ HgCl_2 (▲) or $5 \times 10^{-5}\text{ M}$ CH_3HgCl (▼) for 10 min at 0°C and then transferred to water bath of 35°C . 2-mercaptoethanol was added to the reaction mixture at the points indicated by arrows. The number at each arrow represents the final concentration of 2-mercaptoethanol added as millimolar.

同程度の抑制効果を示した。それに対し、他の金属化合物である Cd^{2+} , Cu^{2+} , 及び Cr^{3+} のチュブリン *in vitro* 重合抑制効果は、いずれも、 $2 \times 10^{-4}\text{ M}$ 以上で現われ、 Zn^{2+} では $5 \times 10^{-4}\text{ M}$ まで抑制効果は認められなかった (Fig. 2)。これらの結果は、比較的多くの金属化合物が *in vitro* チュブリン重合を阻害するが、中でも水銀化合物がより強い抑制効果を持つことを示している。そこで、水銀化合物中、メチル水銀と無機水銀について、チュブリン蛋白質に対する作用をさらに詳細に比較検討した。Fig. 3 は、両水銀化合物について、*in vitro* チュブリンの重合抑制と水銀の結合量の関係を示したものである。50% 重合抑制時における結合量は、メチル水銀では 1 セルのチュブリン二量体当り約 1 モル、無機水銀では、約 0.5 モルに相当し、重合抑制能に水銀の価数が影響していることが示唆された。また、両水銀化合物によってひきおこされた重合抑制が SH 化合物 (dithiothreitol, DTT) により回復されるか否かを検討した結果、Fig. 4 に示したように、メチル水銀では、最終濃度 5.0 mM の DTT により、重合が回復したのに対し、無機水銀では、ほとんど回復がみられなかった。これらの結果から、無機水銀は、メチル水銀に比べ、*in vitro* チュブリン重合抑制効果が強いこと、また、チュブリン蛋白質に対する直接作用は、メチル水銀特有のものではないことが明らかとなった。

程度に差はある、比較的多くの金属化合物が、*in vitro* の無細胞系では、チュブリンに作用することが明らかになったため、これらの化合物の細胞内微小管に対する影響を検討した。各化合物

の mouse glioma の増殖抑制濃度を測定し、その濃度中で培養した細胞の微小管ネットワークを、チュブリンの抗体を用いた間接蛍光抗体法で観察した。その結果、メチル水銀では、添加後 30 分で、微小管ネットワークが希薄になり、60 分後には、ほぼ完全に消失した (Fig. 5 と 6)。それに対し、 Hg^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} 及び Cr^{3+} (Fig. 6) では、60 分後において、微小管ネットワークにほとんど変化が認められなかった^{3,4)}。従って培地に増殖阻止濃度の化合物を添加した場合、メチル水銀のみが細胞内微小管に作用することが明らかとなり、無細胞系の重合抑制実験で示された微小管蛋白質に対する直接作用の強さが、必ずしも細胞内微小管の脱重合作用と対応しないことを示している。

無機水銀が *in vitro* チュブリン重合や、無細胞蛋白合成系等、無細胞系の生理活性蛋白質に対し、メチル水銀より強い抑制効果を示すにもかかわらず、細胞増殖抑制作用がメチル水銀より弱い理由として、無機水銀がメチル水銀にくらべ、はるかに細胞膜という barrier を通過しにくいことが明らかになった⁵⁾。そこで、microinjection の手法を用いて、無機水銀を直接細胞内へ注入した場合の細胞増殖に対する影響及び細胞内微小管に対する影響を検討した。Yamamoto ら⁶⁾により開発されたブリッキング法に従い行った結果、無機水銀の細胞内注入によって 50% 増殖抑制濃度が培地に添加した場合の約 $1/10$ に低下した (Fig. 7)。また、注入された無機水銀が細胞質微小管に特異的に作用した場合に生じることが予測される多核細胞の形成は、全く観察されなかった (Fig. 8)。これらの結果は、無機水銀は、細胞内へ注入され

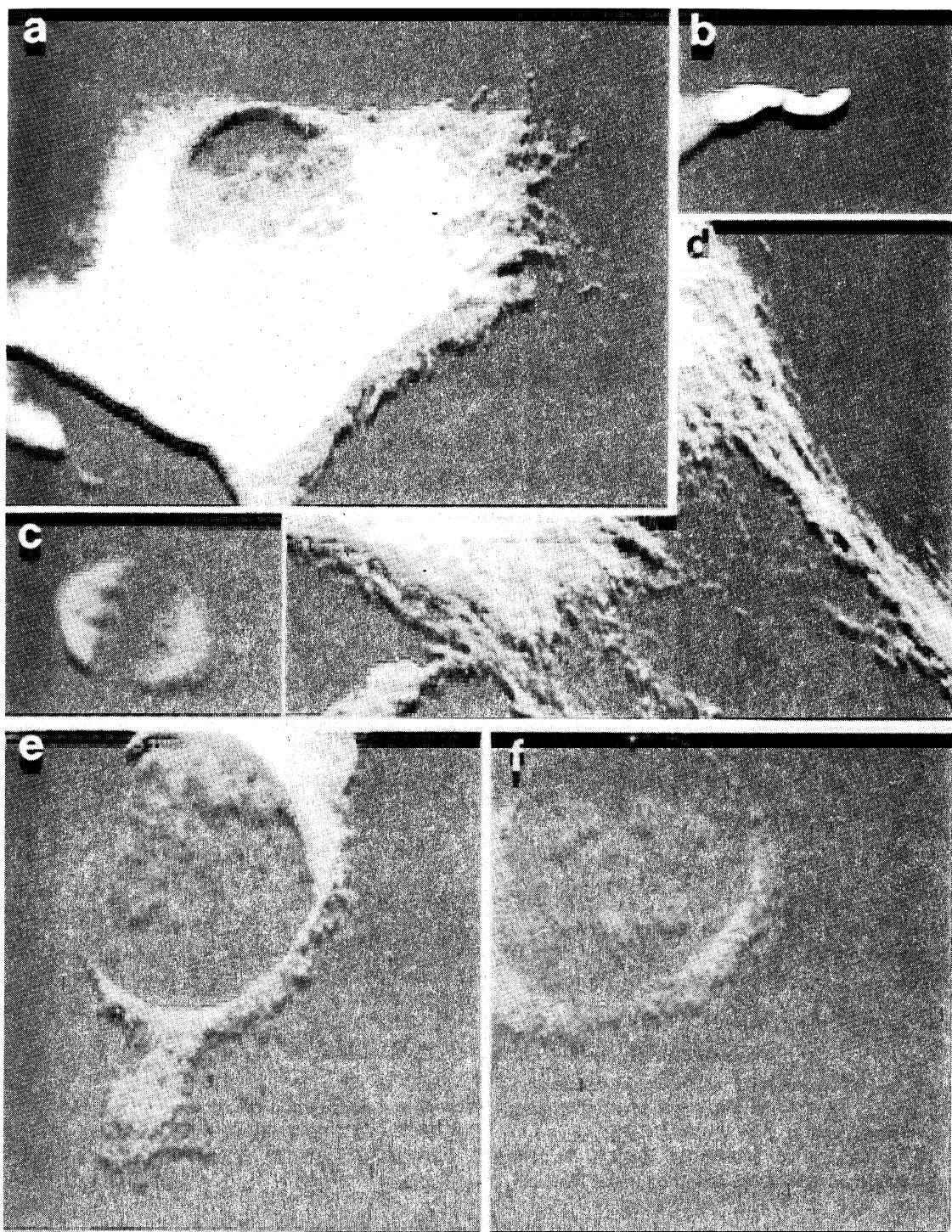


Fig. 5 Specificity of tubulin antiserum immunofluorescence: Effect of Colcemid and antigen absorption. (a-d) Fluorescence of control mouse glioma cells stained with antiserum to tubulin. Fluorescence was observed on microtubule networks (a and d), stem body (b), and mitotic spindle (c). (e) Fluorescence of mouse glioma cells treated with 0.1 μ g/ml Colcemid for 60 min at 37°C prior to fixation and staining. (f) Fluorescence of mouse glioma cells treated with the antiserum absorbed with tubulin prior to incubation. (a-f) $\times 1500$.

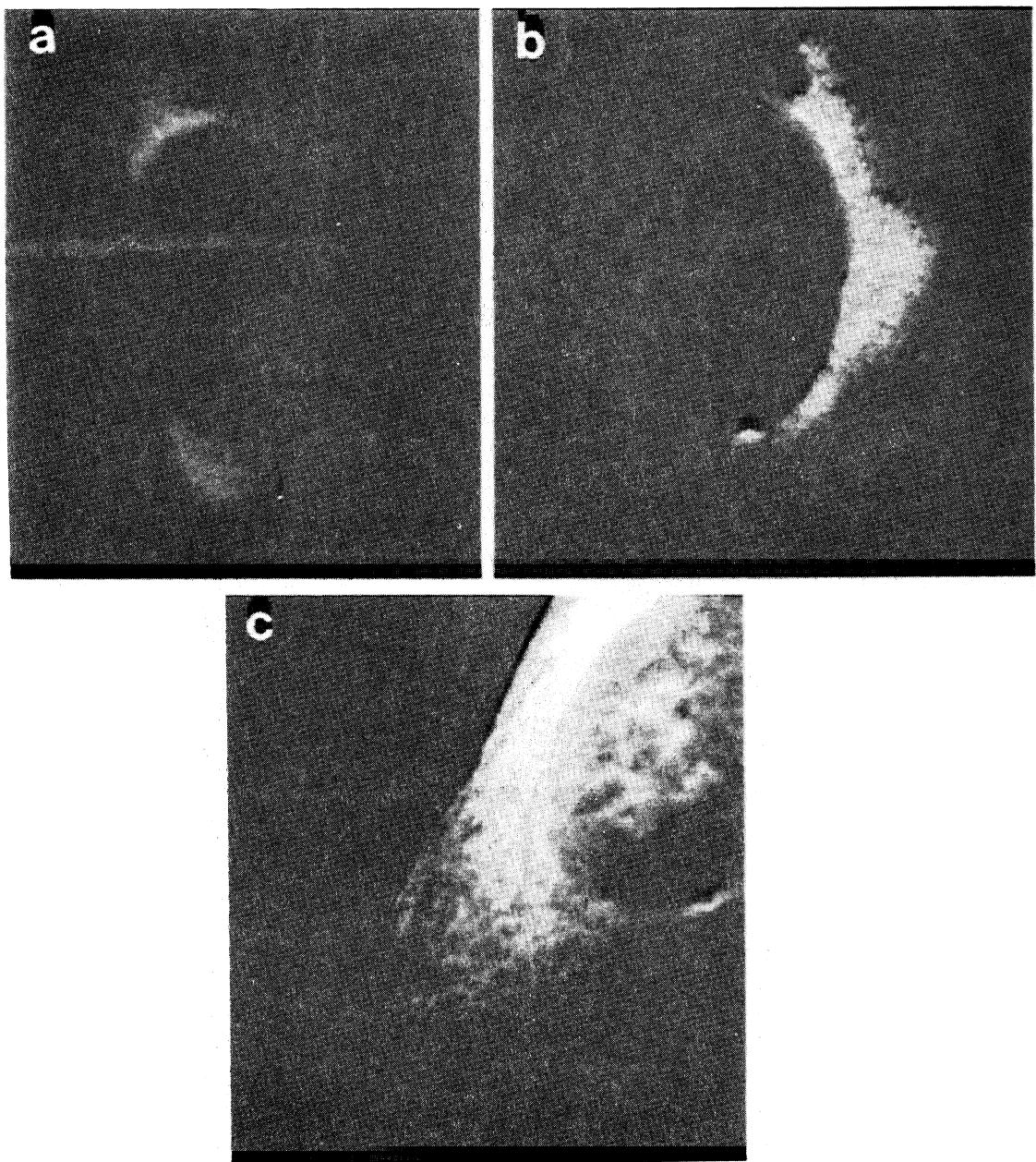


Fig. 6 Immunofluorescence photomicrographs showing the distribution of microtubules in mouse glioma exposed to 5×10^{-6} M CH_3Hg^+ (a and b) or 2×10^{-3} M Cr^{3+} (c). Cells were incubated with 5×10^{-6} M CH_3Hg^+ for 30 min (a), and 1 hr (b) or with 2×10^{-3} M Cr^{3+} for 1 hr (c) at 37°C and fixed with formaldehyde (3.7%) as described under Methods. (a-c) $\times 1500$.

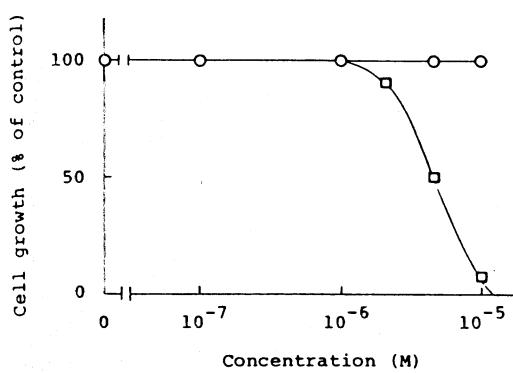


Fig.7 Growth of mouse glioma pricked (□) in the presence of mercuric chloride or incubated without prickling (○)

た場合においても微小管への特異的作用を示さないことを示している。

これまでの研究で、比較的多くの金属化合物が *in vitro* のチブリン重合を阻止するが、それら金属化合物中メチル水銀のみが細胞内微小管に特異的に作用することが明らかとなり、メチル水銀の神経毒性発現との関係を明らかにするため、鶏胚脊髄根の初代培養神経細胞を用いて実験を進めることにした。重金属及び既知の神経毒性物質について、神経線維の生長及び遊出細胞の生長に対する影響を検討した結果、アルキル水銀が神経線維の成長に対し他にくらべて強い抑制効果を示すことが明らかになるとともにメチル水銀により生長が抑制された神経線維内では微小管がほとんど消失していることが確認された。これらの事実は、メチル水銀による神経線維の生長の抑制においても、線維内微小管が主要な標的になっていることを強く示唆している。神経線維内の微小管は、軸索の骨格として、及び軸索流維持という役割に加

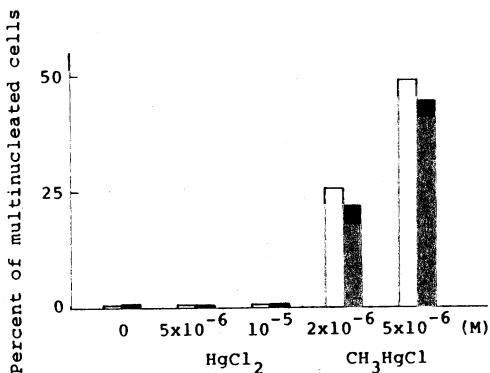


Fig.8 Formation of multinucleated cells by mercury injected into nuclear or cytoplasmic regions of mouse glioma

□ : Nuclear region ■ : Cytoplasmic region

え、軸索の興奮伝達にも重要な役割を担っていることが明らかにされつつある⁷⁾。従って、今後、メチル水銀による軸索の機能障害と微小管の形態変化との関係を検討し、その神経毒性発現における役割を明らかにするための研究を続けたいと考えている。

文 献

- 1) Miura, K. et al., Environ. Res., 17, 453, (1978).
- 2) Miura, K. et al., Ecotoxicol. Environ. Safety, 3, 352 (1979).
- 3) Imura, N. et al., Toxicology, 17, 241, (1980).
- 4) Miura, K. et al., Toxicol. Appl. Pharmacol., 73, 218 (1984).
- 5) Nakada, S. and Imura, N., Neurotoxicology, 3, 249 (1982).
- 6) Yamamoto, F. et al., Exp. Cell Res., 135, 341 (1981).
- 7) Matsumoto, G. et al., J. Biochem., 86, 1155 (1979).

11. 水銀中毒動物の行動と脳内アミン

国立水俣病研究センター基礎研究部

藤崎 正

神経組織に蓄積した水銀がこれら組織機能を障害し、その結果、各種神経症状を惹起することは広く知られた事実である。この神経障害機序の一端を明らかにするため、今回は中枢神経系作用薬の影響を鋭敏に反映させる動物の行動、特に自発運動を指標に脳内アミンの動向との関連でメチル水銀の脳神経系への影響を検討したので報告する。

実験方法

実験には dd-Y 系雄性マウス (25~30 g) と Wistar 系雄性ラット (300~350 g) を用いた。動物の自発運動量 (SMA) は Automex II (東海医理科) を用い、昼間 (7:00~18:00)、夜間 (19:00~6:00) の各 11 時間測定した。又一部短時間の測定実験は昼間 (10:00~12:00) の 2 時間実施した。

条件行動実験は行動科学研究装置 (TECH, SERV 社) を用いた。条件回避反応 (CAR) 実験は回避率が一定 (約 80%) に達したラットを用い、安全期 20 秒、警告期 5 秒、刺激期 5 秒として実施した。一方、条件情動反応 (CER) 実験は定率強化ラットを用い、安全期 4 分、警告期 1 分 (この間にレバーを押すと回避不能の電気刺激負荷が加わる) にセットして実験を行った。

Monoamine 類の測定は動物を断頭後 A 分画；大脳皮質、B 分画；小脳、C 分画；間脳 + 中脳 + 橋 + 延髄および D 分画；脊髄の 4 分画中の Norepinephrine (NE), C 分画中の Dopamine (DA), 5-Hydroxytryptamine (5HT) および 5-Hydroxyindol acetic acid (5HIAA) 量を電気化学的検出器を備えた高速液体クロマトグラフ法¹⁾により測定した。

Monoamine oxidase - A (MAO - A) の測定は Kynuramine を基質とした Hidaka 等 (1967)²⁾ の方法に従って実施したが、MAO - A 活性を分別測定するため、clorgyline 5×10^{-9} M で MAO

- A を阻害後 MAO - B 活性を測定し、総 MAO 活性からの差を MAO - A 活性として算出した。

実験結果

マウス SMA ; マウスに 1, 5, 10 mg/kg/day を連続経口投与した場合の昼間 11 時間の SMA を測定した結果を図 1 に示す。1 mg/kg/day 投与群は 70 日間の投与でも対照群との間に差ではなく SMA の減少は観察されなかった。しかし

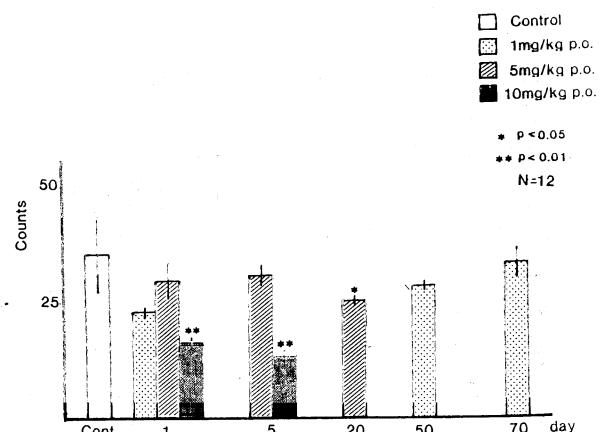


Fig.1 Spontaneous Motor Activity (Light Time)

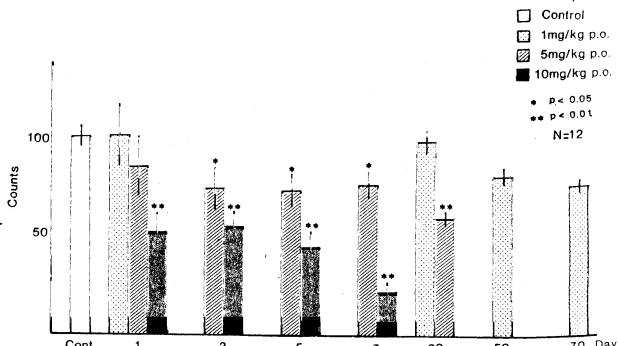


Fig.2 Spontaneous Motor Activity (Dark Time)

5 mg/kg/day 投与群では 20 日間の投与で対照の 71.5% ($P < 0.05$) と減少、10 mg/kg/day 投与群では投与後 1 日で正常群の 46.4% ($P < 0.01$) と急激な減少作用が示された。

一方、マウスの夜間 11 時間の SMA も 1 mg/kg/day では 70 日間投与で低下は認められなかった。5 mg/kg/day 群では投与 3 回で対照の 75.4% ($P < 0.05$) と低下し、10 mg/kg/day では 1 回投与で対照の 52.3% ($P < 0.01$) と SMA の低下が認められた。なお夜間 SMA 量は昼間の 2.9 倍の値を示した。

ラット SMA ; MMC 5 mg/kg/day 連続 10 回経口投与後のラット夜間 12 時間の SMA は最終投与 5 日目で対照群の 56.5% ($P < 0.05$) と減少し、その後暫次減少し、15 日目には 21.3% ($P < 0.01$) と最低値を示した。しかし、15 日以降は経日的に増加傾向を示し、30 日後では対照の 47% まで回復

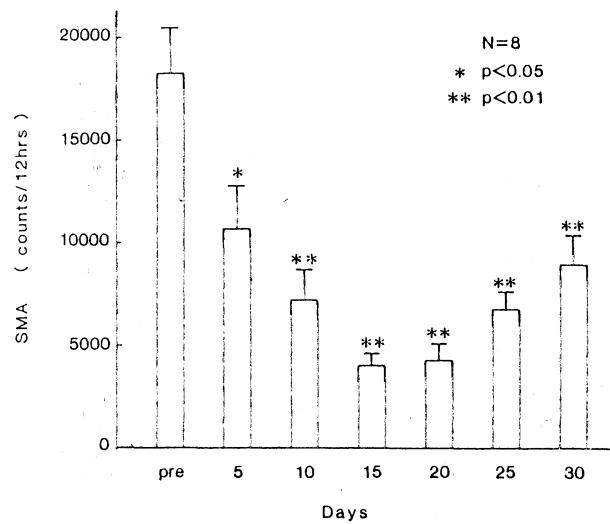


Fig. 3 Effects of MMC on Spontaneous Motor Activity

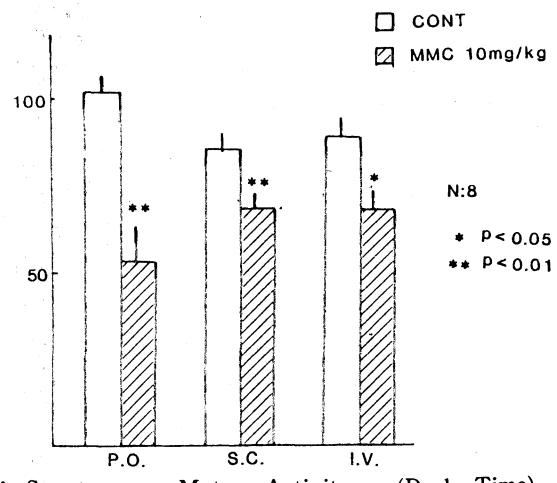


Fig. 4 Spontaneous Motor Activity (Dark Time)

した。

MMC 投与方法と SMA ; マウス SMAに対する MMC の作用が末梢刺激作用を介するものか否か検討するため MMC 10 mg/kg を経口、皮下、静脈内 1 回投与後の夜間 11 時間の SMA 量を測定した結果が図 4 である経口投与群では対照群の 50% ($P < 0.01$) 1 皮下投与群では 84.7 ($P < 0.01$)*、静脈投与群では 76.7 ($P < 0.01$) といづれも正常群に比べ SMA は減少したが、皮下投与および静脈内投与は経口投与群に比べその減少率は少ないものであった。

MMC 処置マウス SMA とアミン関連薬 ; MMC によるマウス SMA 抑制作用と脳内アミンニューロンとの関係を薬理学的手法により検討するため、Methamphetamine (MA) および 6-Hydroxydopamine (6-OHDA) の MMC との併用実験を行った。正常マウスに対し MA 2.0 mg/kg i.p. は 64.4% ($P < 0.01$) の SMA 増加作用を示したが、MMC 10 mg/kg/day p.o. 処置群では MA による SMA 増大作用は消失した。

MMC 2 μ g/2 μ l を両側脳室内に注入後 2 時間の SMA は Vehicle 注入群に比べ 36.8% ($P < 0.05$) 増加した。しかしこの作用は 4 週間前 6-OHDA 処置マウスでは発現しなかった。

MMC 処置マウスの脳内 MAO-A 活性；脳・脊

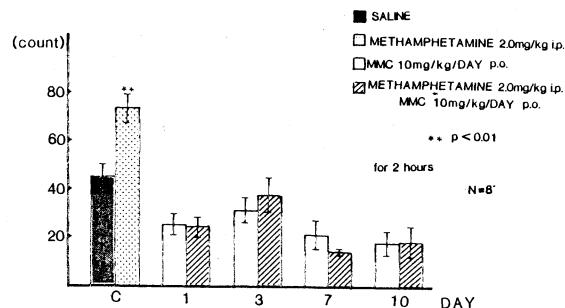


Fig. 5 Effect of Methamphetamine on the Spontaneous Motor Activity MMC Treated Mice

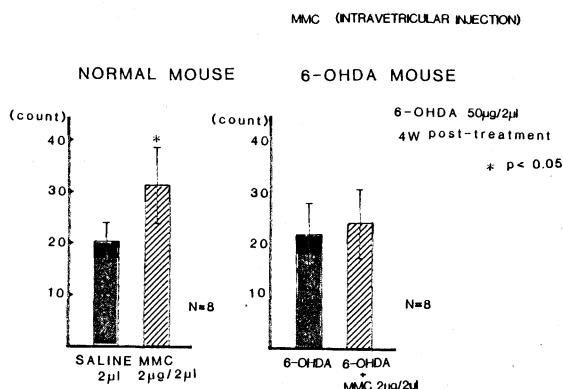


Fig. 6 Effect of MMC on the Spontaneous Motor Activity

脳内MAO-A活性はMMC 10mg/kg/day p.o. 5日目まで小脳の増加($P<0.05$)を除き各脳分画脊髄共変化は認められなかつたが7日目に至り、いづれの部位でも減少した。しかしMAO-B活性はこの間殆んど変化ないか若干の増加現象が認められた。

MMC処置マウスの脳内モノアミノ量；MMC 10mg/kg p.o. 連続投与でのNE量はマウス脳A分画で1日目対照群の45.7% ($P<0.01$)、5日目41.8% ($P<0.01$)、7日目22.7% ($P<0.01$)といづれも上昇した。又C分画では1回投与で対照の21.4% ($P<0.05$)と一時低下したが、7回投与では64.7% ($P<0.01$)の上昇を示した。BおよびD分画では逆にMMC投与初期NEの上昇が認められたが徐々に減少し、7回投与群のB分画は、59.2% ($P<0.01$)、D分画でも67.5% ($P<0.01$)と減少した。

一方、DA、5HTおよび5HIAAについては

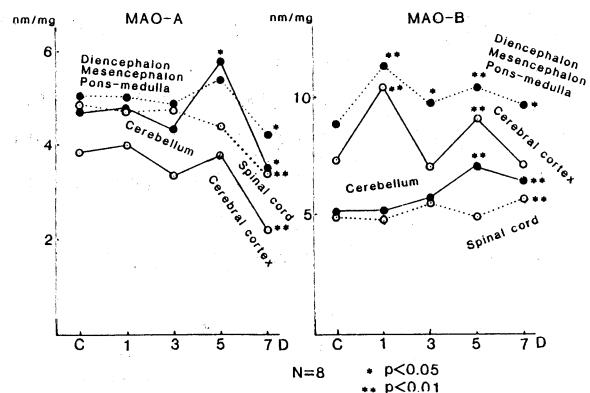


Fig. 7 Effects of MMC on the MAO Activities

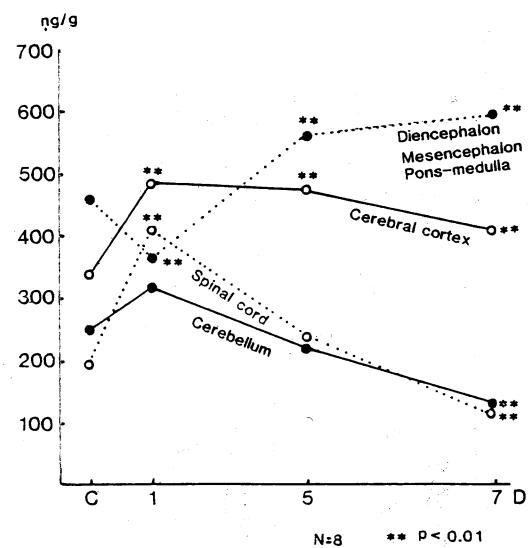


Fig. 8 Effects of MMC on NE Levels in Mouse Brain

C分画について検討した。DAはMMC投与1回で対照の10% ($P<0.05$) 5, 7回でそれぞれ31.0% ($P<0.01$), 25.6% ($P<0.01$)と上昇した。一方5HTおよび5HIAAは1回投与群で64.4% ($P<0.01$)と70.1% ($P<0.05$)といづれも減少、その後一時正常値に復するが7回投与群では5HTが58.1% ($P<0.01$), 5HIAAが61.2% ($P<0.01$)と低下した値を示した。

ラット条件行動、〔CER〕訓練開始と共に、MMC 5mg/kg/day × 10と対照群と比較した結果、CERでは差は認められず、いづれも1日30分、10～15回試行で学習を習得した。しかし、投与終了14日目にMMC投与群で警告期中のレバー押しの増加が示された。

一方、CARでは回避率が80%に達したラットにMMC 5mg/kg/day × 10投与中、1日目では変化はなかったが、5日目以降回避率に有意の低下を示し、それにともない無反応率の増加

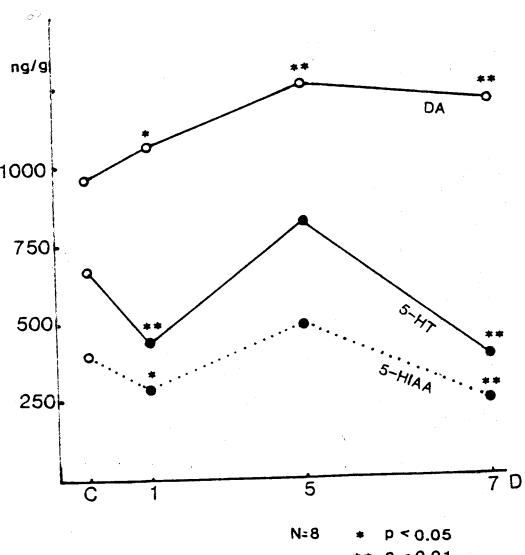


Fig. 9 Effect of MMC on DA, 5-HT and 5-HIAA Levels in Mouse Brain

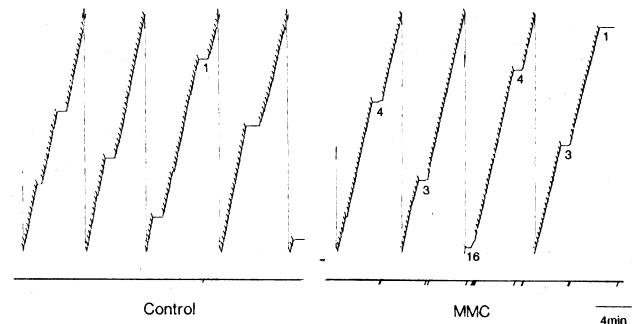


Fig.10 Effects of MMC on Conditioned Emotional Response

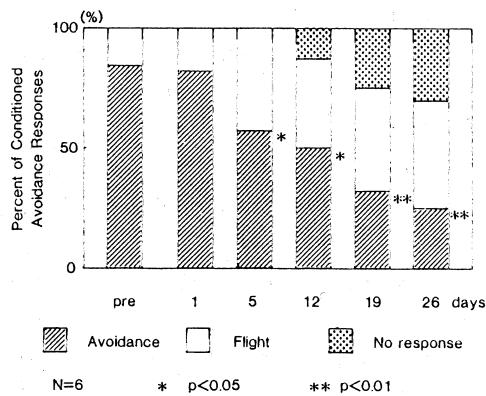


Fig.11 Effects of MMC on Conditioned Avoidance Response

が認められた。

考察および結論

MMC 投与動物に発現する行動変化、特に今回 SMAへの影響を中心に検討した。マウス SMAは MMC曝露量に依存して抑制されたが、この作用は昼間に比べ夜間において著明であった(図 1, 2)。これはマウスが夜行性動物であり、夜間行動量が大であるためと考えられる。ラット SMAも MMC 5mg/kg/day, 10日間連続投与後、15日目までは暫次減少するが、それ以後は徐々に回復傾向を示した(図 3)。MMC投与で発現する SMA抑制作用については成熟マウスを用いた Salvaterra等³⁾の研究や Su等⁴⁾の胎生期 MMC曝露マウスでの報告があるが、その作用機序については不明のままである。ここでは SMAに対する MMCの作用機転を解明するため、現在 SMAに最も関連性が示唆されている脳内カテコールアミン(Creese)⁵⁾との関係で研究を行った。

MMC 2μg/2μlをマウス脳室内投与後2時間の SMAは生食投与群に比べ増加傾向を示す。これは MMCが presynaptic siteから神経伝達物質を一時的に放出する作用(Juang等⁶⁾, Borowitz等⁷⁾, Nakazato⁸⁾のため、SMA関連伝達物質の放出が促進されたものと考えられる。し

Table 1 Effects of Monoamine Related Drugs on the Spontaneous Motor Activity of MMC Treated Mice

	MMC 10mg/kg p.o./day×6	
	1 day after last dose	7 days after last dose
Cont. 1 (intact)	25.9±1.6	
Cont. 2 (MMC)	26.9±2.6	17.6±4.3*
Apomorphine 50mg/kg i.p.	24.3±4.8	25.5±3.9
Imipramine 10mg/kg i.p.	25.3±2.3	27.1±2.4
Reserpine 0.2mg/kg i.p.	12.4±1.5**	5.8±1.6**
Haloperidol 50mg/kg i.p.	25.1±3.3	18.8±2.1
6-OHDA 50μg/A intravent.	32.0±3.1	23.2±4.0
		N=8

* p < 0.05 Compared with intact mice o p < 0.05 Compared with MMC treated mice
** p < 0.01 oo p < 0.01 Compared with MMC treated mice

かし、このMMC脳室内投与による SMA増加はあらかじめ Presynaptic siteを 6-OHDAで破壊したマウスには発現しなかった(図 6)。一方、カテコールアミン放出作用を有する MAのマウス SMA増加作用も MMC処置で消失するが(図 5), 水銀化合物には神経伝達物質を一時的に放出促進後、抑制する作用⁹⁾が報告されており、MAによる脳内アミンの放出した影響を与えていていることが考えられる。この他、DA agonistである Apomorphine の SMA増加作用およびカテコールアミン取込み阻害剤である Imipramine の作用は MMCで影響を受けなかった(表 1)。一方、Reserpine および DA遮断剤 Haloperidol は MMCの SMA抑制作用を増強した。

上記の研究から MMCの SMAへの影響には脳内カテコールアミンの関与が大であると考えられるが、脳内アミン量への MMCの作用は図 8, 9に示されるように NEは小脳、脊髄では減少したが他の部位では DA同様増加が認められた。この増加の理由としては MMC曝露ラットの脳 Synaptosomでの DA代謝回転の低下、DAおよび N

Eの取込みの促進作用¹⁰⁾が認められており、又我々の実験でもImipramineがMMC中毒を若干ながら抑制する傾向が示し、この他カテコールアミン酸化酵素であるMAO-A活性がMMCにより低下すること(図7)を合せ考えれば理解出来る結果であろう。更にはMMCはPost synaptic siteでのAdenylate cyclase活性を阻害するという報告¹¹⁾もあり、MMCはSynaptosomal伝達機構に影響を与える、脳神経伝達系に関与することでSMAを抑制しているものと考える。

ラット逃避行動(図11)および情動行動(図10)もMMCで抑制されるが、この機序については今回脳内5HTの低下が示されているので、5HTニューロンとの関係で更に研究する必要があると考える。

文 献

- 1.) H. Hidaka, T. Nagatsu and K. Yagi, *Anal. Biochem.*, 19, 388 (1967)
- 2.) H. Echizen and C. R. Freed, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 220, 579 (1982)
- 3.) P. Salvaterra, B. Lown, J. Morganti and E. J. Massaro, *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, 33, 177 (1973)
- 4.) M. Su and G. T. Okita, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 38, 195 (1976)
- 5.) I. Creese and S. D. Iversen, *Brain Research*, 83, 419 (1975)
- 6.) M. S. Juang and K. Yonemura, *Nature*, 256, 17 (1975)
- 7.) J. L. Borowitz, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 28, 82 (1974)
- 8.) Y. Nakazato, T. Asono and A. Ohga, *Toxicology and Applied Pharmacology*, 48, 171 (1979)
- 9.) O. Binah, U. Meiri and H. Rahaminoff, *European J. of Pharmacology*, 51, 453 (1978)
- 10.) F. J. Seidler and T. A. Slofbin, *Life Sciences*, 35, 657 (1984)
- 11.) D. R. Storm and R. P. Gunsalus, *Nature*, 250, 778 (1974)

5. 研究発表一覧

1. 臨 床 部

(1) 学術研究会による発表

- (1) 上土橋浩, 吉田義弘, 堤美喜子, 桑野麗雄, 三嶋 功, 井形昭弘
胎児性水俣病患者に対する末梢性筋弛緩剤ダントリウムの効果. 第21回日本リハビリテーション医学会総会, 昭和59年7月(松山)
- (2) 上土橋浩, 吉田義弘, 桑野麗雄, 三嶋 功, 若宮純司, 日吉俊紀, 井形昭弘
サーモグラフィーによる末梢神経障害の客観的評価. 第25回日本神経学会総会, 昭和59年5月(札幌)
- (3) 吉田義弘, 上土橋浩, 皆内康広, 徳永秀次, 浜田陸三, 中島洋明, 井形昭弘
末梢神経疾患の下肢皮膚温について. 第25回日本神経学会総会, 昭和59年5月(札幌)
- (4) 堤美喜子, 有村祐子, 上土橋浩, 有村公良
水俣病患者の在宅訪問. 第6回九州地区理学療法士・作業療法士合同研修学会, 昭和59年11月(別府)
- (5) 村尾光治, 井上 稔, 藤崎 正
胎生期メチル水銀曝露マウスの行動および脳内アミン変化. 第37回日本薬理学会西南部会, 昭和59年10月(鹿児島)
- (6) 有村公良, 若宮純司, 桑野麗雄, 三嶋 功
サーモグラフィーによる末梢自律神経障害の客観的評価. 水俣病検診・審査促進研究班・判断困難な事例研究班合同研究会, 昭和60年1月(東京)
- (7) 大堀八州一, 古田 茂, 大山 勝
聴力障害—中間反応を中心に—. 水俣病検診・審査促進研究班・判断困難な事例研究班合同研究会, 昭和60年1月(東京)
- (8) 大堀八州一, 小幡悦郎, 古田 茂, 大山 勝
水俣病患者の聴性中間反応検査の検討. 第11回日耳鼻南九州合同地方会, 昭和60年2月(鹿)

児島)

- (9) 有村公良, 若宮純司, 桑野麗雄, 三嶋 功
水俣病における骨代謝の検討. 昭和59年度水俣病に係わる調査研究合同討議, 昭和60年2月
(東京)
- (10) 若宮純司, 有村公良, 桑野麗雄, 三嶋 功
水俣病の歩行障害に関する研究. 昭和59年度水俣病に係わる調査研究合同討議, 昭和60年2月
(東京)
- (11) 大堀八州一, 古田 茂, 大山 勝
水俣病症例における聴性中間反応検査の検討. 昭和59年度水俣病に係わる調査研究合同討議,
昭和60年2月(東京)
- (12) 村尾光治, 井上 稔, 福田健夫
ラット条件行動におよぼす塩化メチル水銀の影響. 昭和59年度水俣病に係わる調査研究合同
討議, 昭和60年2月(東京)
- (13) 有村公良, 米永美香, 井形昭弘
Eaton-Lambert型神経筋伝達ブロックを伴った重症筋無力症の2例. 第14回日本脳波・筋
電図学会学術大会, 昭和59年11月(北九州)
- (14) 若宮純司, 日吉俊紀, 井形昭弘, 前田實行, 大迫英彦, 上土橋浩
振動病における振動負荷後の皮膚温の検討. 第25回日本神経学会総会, 昭和59年5月(札幌)
- (15) 若宮純司, 森進一郎, 有村公良, 音瀬廣章, 宇根文穂, 納 光弘, 井形昭弘
食餌性骨軟化症の1例. 第185回日本内科学会九州地方会, 昭和59年5月(大分)
- (16) 若宮純司, 井形昭弘
神経疾患におけるサーモグラフィーの有用性. 第1回サーモグラフィー学会, 昭和59年6月
(東京)
- (17) 岡留敏秀, 納 光弘, 中村尚人, 有村公良, 福永秀敏, 江夏基夫, 井形昭弘, 新名主宏一,
大勝洋祐, 松本秀也
知能低下・神経原性筋萎縮・錐体路症状・血清CK高値を呈し筋病理上 ragged red fiber
を認めた一症例. 第86回日本神経学会九州地方会, 昭和59年6月(福岡)
- (18) 若宮純司, 丸山芳一, 宇根文穂, 音瀬廣章, 有村公良, 納 光弘, 栗山 勝, 井形昭弘

Paraproteinemia を伴った motor neuron disease の一症例. 第86回日本神経学会九州地方会, 昭和59年6月(福岡)

- (19) 森進一郎, 有村公良, 若宮純司, 宇根文穂, 納 光弘, 井形昭弘
Polyneuropathy を合併した Bartter 症候群の1例. 第186回日本内科学会九州地方会, 昭和59年9月(北九州)
- (20) 岩田真一, 園田 健, 若宮純司, 宇根文穂, 納 光弘, 井形昭弘
舌咽神経痛による失神発作の一例. 第16回鹿児島救急医学会, 昭和59年9月(鹿児島)
- (21) 松本秀也, 新名主宏一, 大勝洋祐, 若宮純司
視床出血回復期に難治性吃逆で発症した Wallenberg 症候群の1例. 第16回鹿児島救急医学會, 昭和59年9月(鹿児島)

(1) 学術刊行物による発表

- (1) 上土橋浩, 吉田義弘, 堤美喜子, 桑野麗雄, 三嶋 功, 井形昭弘
胎児性水俣病患者に対する末梢性筋弛緩剤ダントリウムの効果. 第21回日本リハビリテーション医学会総会抄録集, 1983, pp90
- (2) 堤美喜子, 有村祐子, 上土橋浩, 有村公良
水俣病患者の在宅訪問. 第6回九州地区理学療法士・作業療法士合同研修学会誌, 1984, pp 28-30
- (3) 上土橋浩, 吉田義弘, 黒子武道, 園田 健, 中島洋明, 井形昭弘
末梢神経疾患における皮膚血管拡張反応. 第37回日本自律神経学会総会要旨集, 1984, pp 60
- (4) 上土橋浩, 有村公良, 丸目奈緒美, 吉田義弘, 井形昭弘
歩行解析システムによる失調性歩行の解析. 臨床神経, 25: 241, 1984
- (5) 上土橋浩, 吉田義弘, 桑野麗雄, 三嶋 功, 若宮純司, 日吉俊紀, 井形昭弘
サーモグラフィーによる末梢神経障害の客観的評価. 臨床神経, 24: 1337, 1984
- (6) 大堀八州一, 古田 茂, 大山 勝
聴力障害－中間反応を中心－. 水俣病検診・審査促進に関する調査研究, 日本公衆衛生協会, 1985

- (7) 有村公良, 若宮純司, 桑野麗雄, 三嶋 功
サーモグラフィーによる末梢自律神経障害の客観的評価. 水俣病検診・審査促進に関する調査研究, 日本公衆衛生協会, 1985
- (8) 有村公良, 若宮純司, 桑野麗雄, 三嶋 功
水俣病における骨代謝の検討. 昭和59年度水俣病に係わる調査研究, 日本公衆衛生協会, 1985, pp.60-62
- (9) 若宮純司, 有村公良, 桑野麗雄, 三嶋 功
水俣病の歩行障害に関する研究. 昭和59年度水俣病に係わる調査研究, 日本公衆衛生協会, 1985
- (10) 大堀八州一, 古田 茂, 大山 勝
水俣病症例における聴生中間反応検査の検討. 昭和59年度水俣病に係わる調査研究, 日本公衆衛生協会, 1985, pp.76-77
- (11) 福田健夫, 村尾光治, 井上 稔
ラット条件行動に及ぼす塩化メチル水銀の影響. 昭和59年度水俣病に係わる調査研究, 日本公衆衛生協会, 1985, pp.27-28
- (12) 有村公良, 米永美香, 井形昭弘
Eaton-Lambert 型神経筋伝達ブロックを伴った重症筋無力症の2例, 第14回日本脳波・筋電図学会学術大会予稿集, 1984, pp.132

2. 基礎研究部

(1) 学術研究会による発表

(1) 井上 稔

妊娠マウスに投与されたメチル水銀が出生仔におよぼす影響. 第11回日本毒科学会学術年会, 昭和59年7月(京都)

(2) 井上 稔, 村尾光治, 梶原裕二

妊娠中にメチル水銀投与をうけたマウス出生仔の行動および脳の観察. 第24回日本先天異常学会学術集会, 昭和59年7月(東京)

(3) 安武 章, 平山紀美子, 村尾光治, 井上 稔, 藤崎 正

メチル水銀尿中排泄のマウス系統差. 第31回日本実験動物学会総会, 昭和59年10月(東京)

(4) 平山紀美子, 安武 章, 藤崎 正

マウスにおけるメチル水銀動態の雌雄差に関する研究. 第58回日本薬理学会総会, 昭和60年3月(東京)

(5) 平山紀美子

メチル水銀の生体内動態及び毒性について. 第2回九州実験動物研究会, 昭和60年3月(熊本)

(6) 中村邦彦, 藤崎 正

水俣湾泥土より分離した水銀耐性菌に関する基礎的研究. 第11回日本毒科学会学術年会, 昭和59年7月(京都)

(7) 赤木洋勝, 菅野 淳

ジチゾン抽出一ガスクロマトグラフィーによる微量メチル水銀の分析法とその環境試料への応用. 第11回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム, 昭和59年10月(札幌)

(8) 松居由美子, 熊谷幹郎, 西村 肇, 赤木洋勝

水銀の動物プランクトンへの蓄積に関する研究. 昭和59年度日本海洋学会秋季大会, 昭和59年10月(京都)

(9) 安藤祥司, 安武 章, 西野憲和, 脇 道典, 泉屋信夫

ダイズBowman-Birkインヒビター抗キモトリプシン部位を含む二環状ペプチドの合成と性質、

(2) 学術刊行物による発表

- (1) Inouye, M.
Long-term effects of prenatal methylmercury exposure on the development of the mouse brain. J. Toxicol. Sci., 9: 295, 1984
- (2) 井上 稔
妊娠マウスに投与されたメチル水銀が出生仔におよぼす影響. 第11回日本毒科学会学術年会要旨集, 1984, pp.61
- (3) Inouye, M., Murao, K. and Kajiwara, Y.
Long-term behavioral and neuropathological effects of prenatal methylmercury exposure in mice. Teratology, 30: 10A, 1984
- (4) 井上 稔, 村尾光治, 梶原裕二
妊娠中にメチル水銀投与をうけたマウス出生仔の行動および脳の観察. 先天異常, 24: 199, 1984
- (5) 安武 章, 平山紀美子, 村尾光治, 井上 稔, 藤崎 正
メチル水銀尿中排泄のマウス系統差. 第31回日本実験動物学会総会講演要旨集, 1984, pp.88
- (6) Hirayama, K., Murao, K. and Fujisaki, T.
Effect of methylmercury on brain adenylate cyclase activity in rats. Japan. J. Pharmacol., 36: Suppl. 223, 1984
- (7) 平山紀美子, 安武 章, 藤崎 正
マウスにおけるメチル水銀動態の雌雄差に関する研究. 第58回日本薬理学会総会要旨集, 1985, pp.313
- (8) 平山紀美子
メチル水銀の生体内動態及び毒性について. 第2回九州実験動物研究会・抄録, 1985, pp.2
- (9) Nakamura, K. and Fujisaki, T.
Characteristics of Hg-resistant bacteria isolated from Minamata Bay sediment. J. Toxicol. Sci., 9: 301, 1984

- (10) 中村邦彦, 藤崎 正
水俣湾泥土より分離した水銀耐性菌に関する基礎的研究. 第11回日本毒科学会学術年会要旨集, 1984, pp.73
- (11) Akagi, H. and Kanno, A.
A method for the determination of trace amounts of methylmercury by combined dithizone extraction and gas chromatography and its application to environmental samples. Eisei Kagaku, 31: 42, 1985
- (12) 赤木洋勝, 菅原 淳
ジチゾン抽出一ガスクロマトグラフィーによる微量メチル水銀の分析法とその環境試料への応用. 第11回環境汚染物質とそのトキシコロジーシンポジウム講演要旨集, 1984, pp.94—96
- (13) 安藤祥司, 安武 章, 西野憲和, 脇 道典, 泉屋信夫
ダイズBowman-Birkインヒビター抗キモトリプシン部位を含む二環状ペプチドの合成と性質. 第21回化学関連支部合同九州大会講演予稿集, 1984, pp.79
- (14) Kiyono, S., Seo, M. L., Shibagaki, M. and Inouye, M.
Facilitative effects of maternal environmental enrichment on maze learning in rat offspring. Physiol. Behav., 34: 431-435, 1985
- (15) 井上 稔, 織田銃一, 島村和位, 亀山義郎
発生および発生異常. 近藤恭司監修, シンクス 実験動物としての食虫目トガリネズミ科動物の生物学, 学会出版センター(東京), 1985. pp.140—154

3. 疫学研究部

(1) 学術研究会による発表

- (1) Tamashiro, H., Arakaki, M., Suzuki, T., Shibata, Y., Akagi, H. and Futatsuka, M.
A mortality and natality study in the methylmercury-polluted area in Japan. The Xth international Epidemiological Association Scientific Meeting, August, 1984 (Canada)
- (2) Shibata, Y., Tamashiro, H., and Futatsuka, M.
Mortality in methylmercury polluted area in Japan. The XIIth International Biometric Conference, September, 1984 (Tokyo)

- (3) 玉城英彦, 新垣幹男, 柴田義貞, 赤木洋勝, 二塚 信
八代海沿岸地域における糖尿病の疫学的研究(1) 一複合死因糖尿病の疫学特性の経年変化について— 第54回日本衛生学会総会, 昭和59年4月(鳥取)
- (4) 玉城英彦, 新垣幹男, 柴田義貞, 鈴木猛郎, 赤木洋勝, 二塚 信
メチル水銀汚染地域住民の出生力に関する研究. 第43回日本公衆衛生学会総会, 昭和59年11月(大阪)
- (5) 新垣幹男, 玉城英彦, 赤木洋勝, 村尾光治, 平山紀美子
メチル水銀の毒性に及ぼす因子に関する研究—エタノールの影響—. 第43回日本公衆衛生学会総会, 昭和59年11月(大阪)
- (6) 野村 茂, 二塚 信, 柴田義貞, 玉城英彦, 鈴木猛郎, 新垣幹男
水俣病患者のS M Rと生存率について. 昭和59年度水俣病に係る調査研究合同討議, 昭和60年2月(東京)
- (7) 新垣幹男, 玉城英彦, 二塚 信
水俣病多発地区における人口学的研究—その1—. 第49回日本民族衛生学会総会, 昭和59年7月(弘前)
- (8) 玉城英彦, 新垣幹男, 二塚 信
水俣病多発地区における人口学的研究—その2—. 第49回日本民族衛生学会総会, 昭和59年7月(弘前)
- (9) 柴田義貞
3母数ガンマ分布, ワイブル分布の推定問題. Non-Regular Statistical Estimation 研究集会, 昭和59年6月(京都)
- (10) 柴田義貞
巾ガンマ分布とその応用. 日本品質管理学会第25回研究発表会, 昭和59年4月(東京)
- (11) 柴田義貞
平均値の差の検定について. 応用統計学会1984年度年会, 昭和59年4月(東京)
- (12) 柴田義貞
ワイブル分布の母数推定—モーメント法と最尤法. 日本数学会1984年度年会, 昭和59年4月(大阪)

- (13) Shibata, Y.
Power-gamma distribution and its applications. China-Japan Symposium on Statistics, November, 1984 (Beijing)
- (14) 柴田義貞
指数分布の母平均に対する最短信頼区間の近似。文部省科学研究費総合研究A「極限定理と確率分布の近似」研究集会, 昭和59年12月(東京)
- (15) 柴田義貞
死亡率の標準化について。第43回日本公衆衛生学会総会, 昭和59年11月(大阪)
- (16) 柴田義貞
標準化死亡比による死亡率比較の妥当性。文部省科学研究費総合研究A「生存時間の統計解析と医学薬学への応用」研究集会, 昭和60年2月(東京)
- (2) 学術刊行物による発表
- (1) Tamashiro, H., Arakaki, M., Akagi, H., Futatsuka, M. and Roht, L. H.
Causes of death in Minamata disease: analysis of death certificates.
Int. Arch. Occup. Environ. Health, 54: 135-146, 1984
- (2) 玉城英彦, 新垣幹男, 柴田義貞, 赤木洋勝, 二塚信
八代海沿岸地域における糖尿病の疫学的研究—記載死因糖尿病の疫学特性の経年変化について。日本衛生学雑誌, 39: 938-948, 1985
- (3) Tamashiro, H., Arakaki, M., Suzuki, T., Shibata, Y., Akagi, H. and Futatsuka, M.
A mortality and natality study in the methylmercury-polluted area in Japan. Abstracts of the Xth International Epidemiological Association Scientific Meeting, 1984, pp. 235
- (4) Shibata, Y., Tamashiro, H. and Futatsuka, M.
Mortality in methylmercury polluted area in Japan. Abstracts of the XIIth International Biometric Conference, 1984, pp. 26

- (5) 玉城英彦, 新垣幹男, 柴田義貞, 赤木洋勝, 二塚 信
八代海沿岸地域における糖尿病の疫学的研究(1)—複合死因糖尿病の疫学特性の経年変化について—. 日本衛生学雑誌, 39: 84, 1984
- (6) 新垣幹男, 玉城英彦, 赤木洋勝, 村尾光治, 平山紀美子
メチル水銀の毒性に及ぼす因子に関する研究—エタノールの影響—. 日本公衆衛生雑誌, 31: 686, 1984
- (7) 玉城英彦, 新垣幹男, 柴田義貞, 鈴木猛郎, 赤木洋勝, 二塚 信
メチル水銀汚染地域住民の出生力に関する研究. 日本公衆衛生雑誌, 31: 685, 1984
- (8) 野村 茂, 二塚 信, 柴田義貞, 玉城英彦, 鈴木猛郎, 新垣幹男
水俣病患者のS M Rと生存率について. 水俣病に関する総合的研究 (昭和59年度環境庁公害防止等調査研究委託費による報告書), 水俣病に関する総合的研究班, 日本公衆衛生協会, 1985, pp. 1—2
- (9) 新垣幹男, 玉城英彦, 二塚 信
水俣病多発地区における人口学的研究—その1—. 民族衛生, 50: 68—69, 1984
- (10) 玉城英彦, 新垣幹男, 二塚 信
水俣病多発地区における人口学的研究—その2—. 民族衛生, 50: 70—71, 1984
- (11) 緒方裕光, 松原純子, 柴田義貞
多重環境要因の複合効果の統計解析—対数線形モデルによる分析—. 応用統計学, 13: 105—114, 1985
- (12) Shibata, Y.
Power-gamma distribution and its applications. Proceedings of China-Japan Symposium on Statistics, Peking University, 1984, pp. 238-242
- (13) 柴田義貞
日本エム・イー学会編, 臨床MEハンドブック. 医学書院／コロナ社, 1984
- (14) 柴田義貞
物理学辞典編集委員会編, 物理学辞典. 培風館, 1984
- (15) 柴田義貞
3母数ワイブル分布の推定問題. 数理解析研究所講究録, 538: 153—167, 1984

- (16) 柴田義貞
正規分布は万能か. 数学セミナー, 23: 24-30, 1984
- (17) 柴田義貞
巾ガンマ分布とその応用. 日本品質管理学会第25回研究発表会講演予稿集, 1984, pp. 33-36
- (18) 柴田義貞
平均値の差の検定について. 応用統計学会1984年度年会講演予稿集, 1984, pp. 25-29
- (19) 柴田義貞
ワイブル分布の母数推定—モーメント法と最尤法. 日本数学会1984年度年会統計数学分科会講演アブストラクト, 1984, pp. 103-104
- (20) 柴田義貞
3母数ガンマ分布, ワイブル分布の推定問題. Non-Regular Statistical Estimation 研究集会予稿集, 1984, pp. 15-16
- (21) 柴田義貞
死亡率の標準化について. 日本公衆衛生雑誌, 31: 155, 1984
- (22) 柴田義貞
標準化死亡比による死亡率比較の妥当性. 文部省科学研究費総合研究A「生存時間の統計解析と医学薬学への応用」予稿集, 1985, pp. 4-8
- (23) 柴田義貞
指数分布の母平均に対する最短信赖区間の近似. 文部省科学研究費総合研究A「極限定理と確率分布の近似」予稿集, 1984, pp. 8-10

6. 国立水俣病研究センターの概要

1. 予 算

(当初予算 単位:千円)

区分	53年度	54年度	55年度	56年度	57年度	58年度	59年度
運 営 費	415,003	495,067	320,423	355,860	412,636	385,773	380,172
人 件 費	15,086	77,891	89,506	105,213	111,782	116,040	125,833
事務処理費	72,273	104,317	100,283	107,022	109,193	94,999	95,792
試験研究費	327,644	312,859	130,634	143,625	191,661	174,734	158,547
施設整備費	63,673	20,748	0	36,914	36,914	31,280	30,520

なお、センター発足以前の施設整備費は、50年度 152,822千円、51年度 255,845千円、52年度 442,752千円である。

2. 定 員

区分	53年度	54年度	55年度	56年度	57年度	58年度	59年度
総務課	4	5	5	5	5	5	5
臨床部	1	6	7	8	9	9	9
基礎研究部	3	4	6	6	6	6	7
疫学研究部		3	5	5	5	5	5
計	8	18	23	24	25	25	26

3. 主要施設整備状況

施 設 名	構 造	面 積	竣 工 時 期
本 館	R C - 4 B - 1 F	$\frac{1,580.58}{3,497.14} \text{m}^2$	53. 3
自 動 車 車 庫	R C - 1	$\frac{35.94}{35.94}$	53. 3
医療特殊ガス・プロパン庫	R C - 1	$\frac{20.32}{20.32}$	53. 3
動 物 実 驗 棟	R C - 1	$\frac{196.98}{196.98}$	53. 3
廃 棄 物 燃 却 炉	R C - 1	$\frac{15.00}{15.00}$	53. 3
薬 液 处 理 機 械 室	C B - 1	$\frac{21.56}{21.56}$	53. 3
ポ ン プ 室	C B - 1	$\frac{7.20}{7.20}$	53. 3
特 殊 廃 液 处 理 室	R - 1	$\frac{30.58}{30.58}$	56. 3
特 殊 廃 棄 物 燃 却 炉	R - 1	$\frac{48.00}{48.00}$	59. 2
S P F 動 物 施 設	R C - 1	$\frac{146.38}{146.38}$	60. 3

4. 主要機器整備状況

昭和59年度までに整備した機器のうち主なものは、次のとおりである。

- 多軌道断層撮影装置（島津製作所 H L - 31）
- 直接撮影装置（島津製作所 I D 150 G - 2）
- 多用途脳波計（三栄測器 I A - 58）
- モジュール式筋電計（三栄測器 M S - 6）
- 医用データ処理装置（三栄測器 7 T - 08）
- 多用途生体電気計測装置（日本光電 R M - 6000）
- 脳波スキャナ（日本光電 M C E - 1400）
- 高速アミノ酸分析計（日製産業 835 - 50）
- 高速液体クロマトグラフ（日製産業 635 A - M）
- 二波長分光光度計（日製産業 557）
- 炎光分光光度計（日製産業 M P F - 4）
- 分離用超遠心器（日製産業 80 P - 7）
- 原子吸光分光光度計（島津製作所 A A 640 - 13）
- 分析電子顕微鏡（日本電子 J E M - 200 C X）
- 超ミクロトーム（丸文 L K B - 2088）
- 電気泳動装置（アムコ L K B - 2138）
- 酵素反応速度測定装置（清水製作所 L K B - 2086 M K - II）
- ガスクロマトグラフ質量分析計（日本電子 J M S - D 300）
- 細胞膜超微流動性測定装置（セントラル科学 M V - 10）
- サーモビューア（日本電子 J I G - M D）
- 上気道粘膜組織の分光解析装置（日製産業 R A - 1500）
- デジタルソナグラフ（新興精機 K A Y - 7800）
- 歩行運動自動解析装置（アニマ）
- 電子スピニ共鳴装置（新興精機 J E S - F E I X G）
- 行動科学研究装置（東海医理科 B R S / L V E）
- コンピューター（F A C O M M150 F）
- カテコールアミンアナライザー（東海医理科 L C 304 D E）
- 誘発反応測定装置（A H S J C A 5200 - 2 P）
- プラズマ発光分光分析装置（新興精機スペクトラパン III B型）
- オートシッパ分光光度計（日立 U - 1080形）
- プリアンプ内蔵圧電型加速度計（T E A C - 505）
- 走査顕微鏡（日本電子 J S M - T 300）
- 万能倒立顕微鏡（ニコン T M D - 2）
- 高圧蒸気滅菌装置（サクラ F R C - G O 9 A 20W）

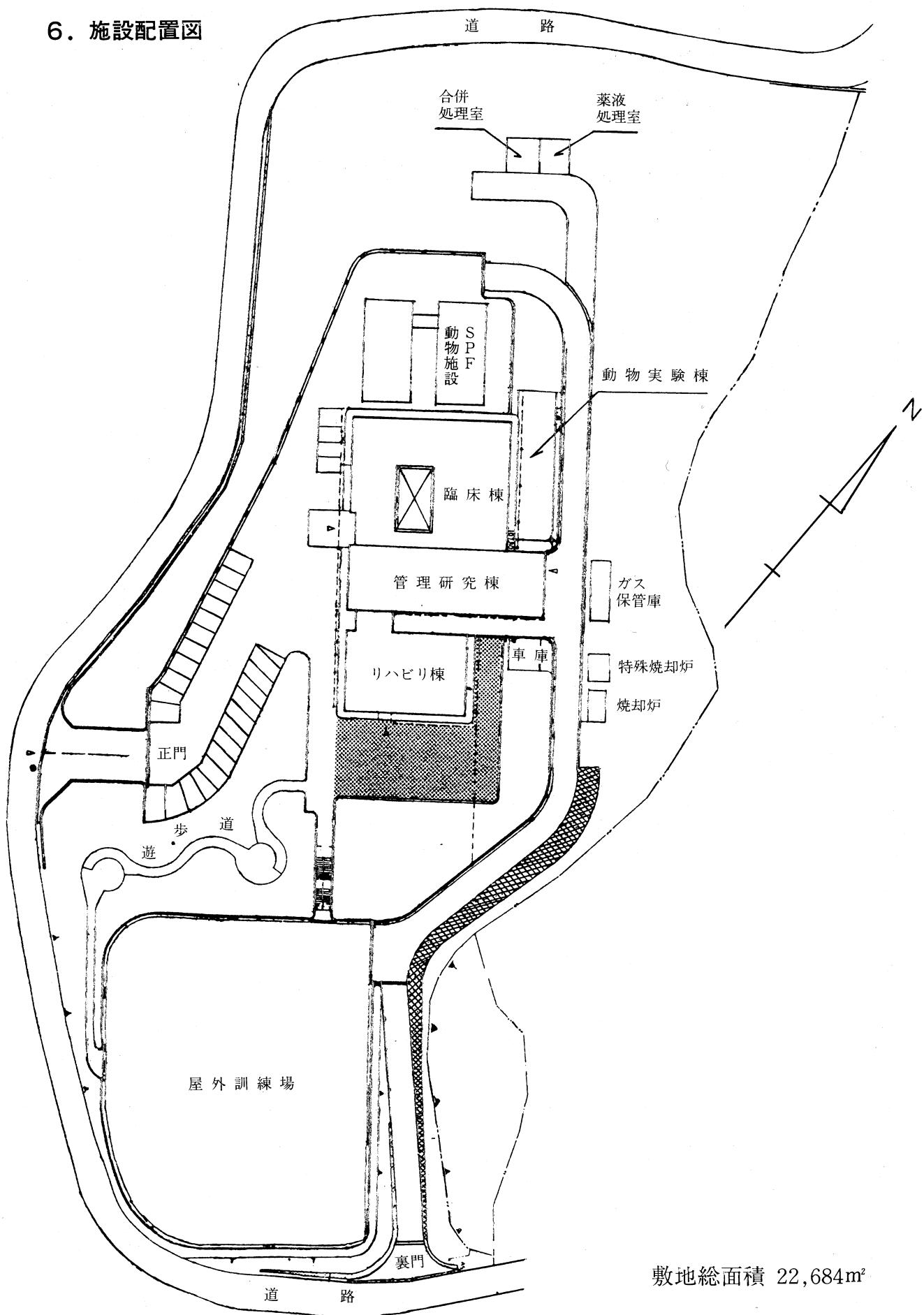
5. 図書および文献等の整備状況

当図書室は59年度末現在、単行本1,950冊、雑誌類153種（和雑誌58種、洋雑誌95種）を所蔵している。

また、水俣病および有機水銀中毒に関する文献の収集・整理を行っており、マイクロフィッシャー3,383枚を備えるとともに、「有機水銀中毒関連文献集」にまとめている。

なお、文献の検索にはJOIS、DIALOGオンライン検索システム等を利用している。

6. 施設配置図



附1. 人事異動

年月日	事由	氏名	備考
59. 4. 1	採用	梶原 裕二	基礎研究部病理室
59. 4. 1	併任	高橋 等	主任研究企画官・熊本大学医学部より
59. 4. 1	併任	二塚 信	疫学研究部調査室・熊本大学医学部より
59. 4. 1	併任	皆良田研介	臨床部眼科室・熊本大学医学部より
59. 4. 1	併任	古田 茂	臨床部耳鼻咽喉科室・鹿児島大学医学部より
59. 4. 1	非常勤	中西 亮二	臨床部内科室・水俣市立病院より
59. 5. 16	採用	宮本謙一郎	臨床部検査室
59. 6. 16	転出	坂本 昭義	総務課経理係長・大蔵省大臣官房会計課へ
59. 6. 16	転入	濱口 敏博	総務課経理係長・大蔵省九州財務局より
59. 7. 16	転出	吉田 義弘	臨床部理学診療科室長・鹿児島大学医学部へ
59. 7. 16	転入	有村 公良	臨床部理学診療科室・鹿児島大学医学部より
59. 10. 1	昇任	玉城 英彦	疫学研究部調査室主任研究員・疫学研究部調査室研究員より
59. 11. 1	採用	大堀八洲一	臨床部耳鼻咽喉科室・鹿児島大学医学部へ
59. 12. 31	辞職	上土橋 浩	臨床部内科室
60. 1. 1	採用	若宮 純司	臨床部内科室
60. 3. 31	辞職	玉城 英彦	疫学研究部調査室主任研究員
60. 3. 31	辞職	新垣 幹男	疫学研究部調査室

附2. 主な来訪者

59年 4月	衆議院議員	藤田スミ議員
5月	米国ロチェスター大学 ハンガリー国公衆衛生疫学研究所 長崎大学医学部	T・Y・島原教授 B・S・ラロリッチ博士 兜 真徳助教授
6月	鹿児島大学工学部 アジアと水俣を結ぶ会 水俣市市長	前田 滋助教授 浜元二徳代表ほか 浮池正基
7月	熊本県水俣病検診センター 環境保護団体グループ10 インドネシア	安武敬昭所長 メイザール・ベ・シャフェイ 女史(医師) ブショラハルジュ事務局長 アクマット・サントサ弁護士
	"	原田正純助教授
	"	谷 洋一ほか 田中 穆所長
	熊本大学医学部附属遺伝医学研究施設 アジアと水俣を結ぶ会 水俣保健所	亀山義郎所長 木下敬之助議員
	名古屋大学環境医学研究所 衆議院議員 衆議院議員	中井 治議員 古賀勝利委員長
	チッソ労組中央執行委員会	荒木淑郎教授
8月	熊本大学医学部第一内科 熊本県庁公害部	松村敏人次長 マイケル・H・スマレンスキイ博士
	米国テキサス大学保健医療センター公衆衛生部	近藤忠孝議員
	参議院議員	15名
	民医連系学生(熊本大学・鹿児島大学等)	川田 進署長
	水俣警察署	芥川大吉次長
9月	水俣保健所	松谷天星丸教授
	藤田学園保健衛生大学医学部	立石健二検事ほか訟務専門官
10月	法務省東京法務局訟務部 宮城県整肢拓桃園	鈴木恒彦主任医長
	総理府公害等調整委員会	大塚正夫委員長
	" 事務局	菊池貞二事務局長 移川事務局員
	熊本県議会公害対策特別委員会	久保一明委員長
11月	国立公衆衛生院地域環境衛生学部 芦北郡津奈木町	松下秀鶴部長
	旭川医科大学医学部	六車孝吉町長 土井陸雄助教授

59年11月	北里大学薬学部	井村伸正教授
	"	永沼 章講師
	和光大学経済学部	三浦郷子助教授
	東京都立神経病院	椿 忠雄院長
	新潟大学理学部	菅野 浩教授
	"	小俣三郎助教授
	鹿児島大学医学部	井形昭弘教授
	"	福田健夫教授
	熊本大学医学部免疫医学研究施設	須田郁夫助手
	"	熊本俊秀講師
	"	武内忠男講師
	熊本市保健衛生研究所	小西鉄郎所長
12月	大阪府立大学農学部	外村健三教授
	熊本大学医学部	浦野 徹助教授
60年1月	名古屋大学工学部	吉村 功助教授
	産業医科大学医学部	古賀 実講師
	"	岩尾総一郎
	〃 W H O 派遣研究員(マレーシア)	ナワン・ビン・アブドル
2月	熊本大学医学部	藤本十四秋教授
	阿蘇国立公園管理事務所	小森順吉所長
	国際協力事業団沖縄支部	研修管理者 2名
	テキサス大学保健医療センター公衆衛生学部	Yun・スル・リー
3月	放射線影響研究所	ケネス・J・コペキン研究員
	熊本大学医学部	野村 茂教授
	鹿児島大学医学部	福田健夫教授
	国立公衆衛生院放射線衛生学部	山県 登部長