有機水銀化合物の毒性 (第1報)
塩化メトキシエチル水銀による水俣病様症状の発現¹⁾

石倉俊治, 井上典子, 与那覇政憲
東京理科大学薬学部²⁾

Toxicity of Organic Mercury Compounds. I.¹⁾
Manifestation of the Minamata Disease-like Symptoms of
Methoxyethylmercuric Chloride

SHUNJI ISHIKURA, NORIKO INOUE, and MASANORI YONAHARA
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Science University of Tokyo²⁾

(Received November 5, 1970)

Diet mixed with different organic mercury compounds was fed continuously to dd strain male mice and mercury content in organs was estimated photometrically by the dithizone method after wet digestion of samples with nitric and sulfuric acids.

Significant difference was observed in growth curves of mice given MEMC in doses of 1250 and 2500 $\mu\text{g Hg/day}$ from that of the control, and specific neural symptoms were observed in almost all the animals.

In the case of MEMC, mercury content in the organs was the highest in the liver, followed by the kidney, spleen, and brain, in the decreasing order. Accumulation of mercury in the liver increased with an increasing dose, but no variation in the amount of accumulated mercury was observed in the kidney. In the case of BMC, accumulation of mercury in the brain was higher than that of MEMC.

緒 言

水銀化合物は工業, 農業, 医療に広く使用されている。これらに使用されるところの無機および有機水銀化合物はいずれも強い毒性を有している。有機水銀化合物はアルキル水銀とアリール水銀とに大別され, アルキル水銀化合物は慢性毒性として中枢神経障害が著しい。熊本県水俣湾, 新潟県阿賀野川流域で発生した水俣病の原因物質としてはアルキル水銀化合物であるメチル水銀が検出された。³⁾ 水俣病は運動失調, 視野狭窄, 言語知覚障害, 難聴, 精神障害などを主徴とする中枢神経障害とされている。実験的には, 水銀化合物を連続的にマウスに投与すると運動障害が認められ, これはマウスにおける典型的な水俣病様症状の1つであり, その型から dolphine

kick convulsion と斎藤らにより命名されている。⁴⁾ 直鎖の低級アルキル水銀化合物であるメチル, エチルおよび *n*-プロピル水銀化合物がこのような症状を発現し, 長鎖のアルキル水銀化合物およびアリール水銀化合物ではこのような症状は認められない。

水銀化合物の生体内分布やその運命に関しては数多くの報告がなされている。アリール水銀化合物を代表する酢酸フェニル水銀 (PMA) は腎臓に特に多く認められ, 肝臓および腎臓中の PMA は時間の経過とともに代謝されて無機水銀として排泄される。⁵⁾ アルキル水銀化合物は吸収され易く, 血中濃度が急速に高まるのが特徴である。一方, 無機水銀化合物は吸収され難く, 吸収されたものは主に腎臓中に蓄積され, 肝臓および脾臓がこれに

1) 本報告の一部は日本薬学会第88年会, 東京, 1968年4月において発表。

2) Location: Funagawara-cho, Shinjuku-ku, Tokyo (東京都新宿区船河原町12)。

3) 内田横男, 生化学, **35**, 430 (1963); 近藤孝子, 薬誌, **84**, 137 (1964); 喜田村正次, 塚本利之, 早川 清, 住野公昭, 紫田孝子, 医学と生物学, **72**, 274 (1966)。

4) M. Saito, T. Osono, J. Watanabe, T. Yamamoto, M. Takeuchi, Y. Ohyagi, H. Katsunuma, Japan. J. Exp. Med., **31**, 277 (1961)。

5) J. C. Gage, Brit. J. indust. Med., **21**, 197 (1964)。

ついでいる。また、アルキル水銀化合物では脳への移行が比較的顕著であり、この点、無機およびアリール水銀化合物とかなりの相違がみられる。アルキル水銀化合物が脳へ移行し易いということは水俣病様症状が中枢神経障害を主徴とすることと一致する。

著者らは、有機水銀化合物の化学構造と毒性およびその生体内での動向との関係を知る目的で、種々の有機水銀化合物をマウスに連続経口投与したところ、塩化メトキシエチル水銀投与群において水俣病様症状の発現を認めたので、生体内分布とを併せ報告する。

実験方法

水銀化合物 水銀化合物は Table I に示した 10 種類を用いた。

塩化ブチル水銀は Marvel ら⁶⁾の方法により、臭化ブチルマグネシウムと昇汞より臭化ブチル水銀と塩化ブチル水銀との混合物を合成し、これをメタノールに溶解させ、酸化銀処理後、希塩酸を加え、塩化ブチル水銀とし、エタノールから再結晶した。特に塩化ブチル水銀および塩化メトキシエチル水銀は薄層クロマト⁷⁾により単一物であることを確認した。

水銀化合物の投与および動物の観察 動物は体重 20 g 前後の dd 系雄性マウスを用い、1 群 10 匹とし、オリエンタル酵母製粉末飼料（1 匹当たり 1 日 5 g 投与）に各種水銀化合物を混和したものを毎日投与した。水銀化合物投与中は毎日各動物を観察し、体重測定は 5 日毎に行なった。水俣病様症状の発現の決定は歩行が困難となり、次いで刺激を与えると、歩行の際に腰部がくびれたようになり、dolphine kick convulsion と呼ばれる痙攣が確認されたものを発症とした。

臓器中水銀の定量 内容約 100 ml のナスコルベンに臓器をとり、臓器約 1 g に対し、硝酸 3 ml および硫酸 5 ml を加え、空冷管および還流冷却器を附し、140°, 約 12 時間、黄色が消え透明になるまで加熱を続け、冷後飽和過マンガン酸カリウム溶液 5 ml を加え、さらに 1—2 時間加熱した。加熱中脱色したら飽和過マンガン酸カリウム溶液を追加し加熱する。分解終了後、40%塩酸ヒドロキシアミンを加えて脱色する。これに 0.5 N 硫酸約 20 ml で空冷管、還流冷却器、コルベンを洗った洗液を合し、0.5 N 硫酸を加え液量を一定にし、これを分解液とした。分解液の一部または全部を分液ロートにとり、 $2 \times 10^{-4} M$ のジチゾン-四塩化炭素 5 ml を加え、分解液中の水銀をジチゾネートとし、アルミナカラムにより

ジチゾネートを単離し、490 m μ における吸光度を測定することにより定量した。⁸⁾

結果

水銀化合物投与動物の行動および体重変化

各種の水銀化合物について Table I に示した投与量によって実験を行なった。

水俣病様症状の発現に関し、現在までに報告されている事項を確認する意味でアルキル水銀として EMC および EMP, アリール水銀として PMA, PMC, PMF, PMHC および TMTS, 無機水銀として MC, アルコキシエチル水銀である MEMC を各群 500 $\mu g Hg/day$ を 30—60 日間連日投与した。投与マウスの体重は EMC および EMP 投与群においては減少が認められたが、その他の投与群においては一定か、あるいは若干増加した。EMC 投与群においては投与後 13 日目から運動障害が観察され、EMP 投与群においては 17 日目から観察され、その後、全例が発症した。その他の投与群においては発症は認められなかった。

次に MEMC については高用量群 (2500 $\mu g Hg/day$), 低用量群 (1250 $\mu g Hg/day$) にわけ、75 日間連続投与した。Fig. 1 に生長曲線を示したが、対照群では投与全期間を通じて体重の増加がみられるが、MEMC 高用量群, 低用量群では徐々に減少した。また、死亡前数日間は急激な体重の減少が認められた。

Fig. 1. Growth Curves of Mice administrated orally with MEMC for 75 Days

I—group: control
II—group: low dose (1250 $\mu g Hg/day$)
III—group: high dose (2500 $\mu g Hg/day$)

投与開始後しばらくすると、高用量群, 低用量群共に対照群に比べ緊張度が増し、過敏状態を呈し、後肢の異常が 10—15 日目頃から、遅くとも 40 日後には観察され

- 6) C. S. Marvel, V. L. Gould, *J. Am. Chem. Soc.*, **44**, 153 (1922).
- 7) G. Westöb, *Acta Chem. Scand.*, **20**, 2131 (1966).
- 8) S. Ishikura, K. Yokota, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **11**, 939 (1963).

TABLE I. Mercury Compounds used in the Experiments

Mercury compounds		Dose (μg Hg/day)
Ethylmercuric chloride (EMC)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{HgCl}$	500
Ethylmercuric phosphate (EMP)	$(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{Hg})_2\text{HPO}_4$	500
Phenylmercuric acetate (PMA)	-HgOCOCH ₃	500
Phenylmercuric chloride (PMC)	-HgCl	500
Phenylmercuric fixtane (PMF)		500
2-Hydroxy-2-phenylmercurioxi-3,5,6,-3,5,6-hexachlorodiphenylethane (PMHC)		500
N-Tolylmercuric-p-toluene-sulfonanilide (TMTS)		500
Mercuric chloride (MC)	HgCl_2	
Methoxyethylmercuric chloride (MEMC)	$\text{CH}_3\text{OCH}_2\text{CH}_2\text{HgCl}$	500, 1250 2500
Butylmercuric chloride (BMC)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{HgCl}$	313, 625 1250, 2500

た。この状態がしばらく持続した後は刺激を与えることにより歩行の際腰部がくびれたようになり、dolphine kick convulsionを示し、しだいに痙攣が激しくなり、わずかの刺激でも歩行時に発現した。その後、歩行は全く不可能になり、このような状態の続いた数日後、ほとんど死亡に至った。高用量群においては投与開始後20日前後から発症がみられ、投与期間中に全て発症し、途中7匹が死亡したが、低用量群においては、6匹が発症し、発症までの期間が40日前後と高用量群に比し遅くなり、途中4匹が死亡した (Fig. 2)。

BMC投与群においては、2500 μg Hg/day投与群が6日間で全例死亡し、1250 μg Hg/day投与群が5-15日、625 μg Hg/day投与群は5-20日で全例が死亡し、発症は認められなかった。313 μg Hg/day投与群においては7匹が20日以上生存したが、その中、後肢の歩行異常が観察されたものもあったが、発症に至らず50日で全て死亡した。

臓器中水銀量

Fig. 2. Duration of Neural Symptoms and Death Day of MEMC Administrated Mice

□ : healthy, ▤ : nervous, ▨ : ataxic, ▧ : Dolphin Kick convulsion, ■ : dead

各種水銀化合物 500 μg Hg/day 投与群の臓器中水銀量を脳、肝臓、腎臓について Fig. 3-5 に示した。

肝臓では EMC, EMP, MEMC および PMA 投与群

Fig. 3. Concentration of Mercury in Liver of Mice administrated orally with Mercuric Compounds ($500 \mu\text{g Hg/day}$)

Fig. 4. Concentration of Mercury in Kidney of Mice administrated orally with Mercuric Compounds ($500 \mu\text{g Hg/day}$)

は高い値を示しているが、その他の投与群ではあまり高い高い蓄積はみられなかった (Fig. 3).

腎臓では、全ての投与群において高い値を示している (Fig. 4).

一方、脳においては運動障害が観察された EMC および EMP 投与群では、投与日数が短いにもかかわらず $20 \mu\text{g Hg/g}$ 前後を示し、MEMC 37 日間投与が約 $10 \mu\text{g Hg/g}$ を示し、その他の投与群では 20 日—39 日間連続投与でも $5 \mu\text{g Hg/g}$ であった (Fig. 5).

次に MEMC $2500 \mu\text{g Hg/g}$ 75 日間連続投与した発症しているマウスの臓器中水銀量および BMC $313 \mu\text{g Hg/day}$ 20 日間連続投与したときの臓器中水銀量を Fig. 6 に示した。

Fig. 5. Concentration of Mercury in Brain of Mice administrated orally with Mercuric Compounds ($500 \mu\text{g Hg/day}$)

Fig. 6. Concentration of Mercury in Organs of Mice administrated orally with MEMC and BMC

1. liver 2. kidney 3. spleen 4. brain
Each values represent the mean of samples from two mice showing the dolphin kick convulsion in MEMC and ten mice not exhibiting any typical neural symptoms in BMC.

MEMC 投与では、水銀濃度は肝臓が最も高く、腎臓、脾臓、脳の順であった (Fig. 6-a). BMC 投与でも肝臓が最も高く、次に腎臓であるが、脳と脾臓の水銀濃度はほとんど同じであった (Fig. 6-b). また、脳中の水銀濃度は、発症した MEMC $2500 \mu\text{g Hg/day}$ 投与群と同程度であったが、BMC 投与群では発症は認められなかった。

EMC, BMC および MEMC の蓄積の比較

水俣病様症状発現に関し、投与量と発症までの期間についてみると、EMC の場合は $500 \mu\text{g Hg/day}$ 投与において 2 週間で発症が認められるに比し、MEMC の場合だと、 $500 \mu\text{g Hg/day}$ 投与においては 60 日間でも発症せず、 $2500 \mu\text{g Hg/day}$ 投与において発症までに 20 日を要する。このように両者間には投与量と発症に至るまでの投与期間とにかなりの差が認められる。

Fig. 7. Concentration of Mercury in Organs of Mice administrated orally with EMC, BMC, and MEMC

Each values represent the mean of samples from five mice in 250 µg Hg/day administration and ten mice in 2500 µg Hg/day administration.

▨ : 250 µg Hg/day for 10 days
 □ : 250 µg Hg/day for 20 days
 ▩ : 2500 µg Hg/day for 20 days

また、BMC と MEMC の臓器中への蓄積態度についても比較するために、EMC、BMC、MEMC 各 250 µg Hg/day を 10 日および 20 日間投与、MEMC 2500 µg Hg/day を 20 日間投与し、臓器中水銀の蓄積を比較した。

Fig. 7 に示すごとく、各化合物 500 µg Hg/day 10 日間投与と 20 日間投与とにおいて蓄積量の著しい増加は認められないが、各化合物の臓器中への蓄積を比較すると、EMC および BMC 投与共に肝臓に最も蓄積し、ついで腎臓、脾臓、脳の前である。しかし、MEMC は腎臓に最も蓄積し、ついで肝臓、脾臓、脳の前である。一方、2500 µg Hg/day 投与では肝臓中に最も蓄積し、ついで腎臓、脾臓、脳の前である。脳においては 500 µg Hg/day 10 日および 20 日間投与共に EMC が高い蓄積を示した。また、EMC および BMC は MEMC の 2 倍あるいはそれ以上の蓄積が認められ、しかも、MEMC 2500 µg Hg/day 投与よりもやや高い値を示しており、BMC は非発症性であるが、発症性の EMC よりは脳へ蓄積しやすい。

考 察

アルキル水銀化合物の中でメチル、エチル、プロピル

水銀化合物は水俣病様症状を発現する。^{4,9)} 著者らは非発症性とされているメトキシ基を有するメトキシエチル水銀をマウスに連続経口投与し、投与量を増加することにより発症を認めることができた。しかし、EMC においては 500 µg Hg/day 投与でも比較的短期間で発症するが、MEMC においては EMC よりも多量の投与で、しかも遅延して発症が認められる (Fig. 2)。

Ulfvarson は¹⁰⁾ 水酸化メトキシエチル水銀の体内での半減期は 4—10 日、アルキル水銀であるメチル水銀化合物は 15—20 日であり、また、水酸化メトキシエチル水銀水酸化フェニル水銀および硝酸水銀 (II) の臓器中への分布を調べ、これらは互によく似た挙動を示し、血液、筋肉、脳中には少なく、腎臓に高い蓄積を示し、メチル水銀化合物は各臓器に高い蓄積を示すと報告している。

一方、メトキシエチル水銀化合物においては、投与量によって肝臓への蓄積の態度が変わることが認められた。すなわち、250 µg Hg/day 20 日間連続投与において、MEMC 投与の肝臓の水銀濃度は腎臓よりかなり低く、EMC 投与においては肝臓と腎臓の水銀濃度はほぼ等しい。しかし、MEMC 2500 µg Hg/day 20 日間連続投与では逆に腎臓より肝臓中の濃度が高く、EMC 250 µg Hg/day 投与における肝臓中濃度の約 1.5 倍に相当する (Fig. 7)。

BMC 投与群においては全く発症が認められなかった。Takeda らは¹¹⁾ 各種水銀化合物のラット体内分布を比較し、EMC および BMC は共に脳に無機およびフェニル水銀化合物よりも蓄積し易いと報告している。Nose は¹²⁾ ラットにメチル、エチル、*n*-プロピルおよびブチル水銀化合物を微量連続経口投与し、*n*-ブチル水銀化合物投与ラットの脳中においても水銀が相当量検出されると報告している。MEMC により発症した動物の脳中水銀量と BMC 313 µg Hg/day 20 日間投与動物の脳中水銀量がほとんど同じにもかかわらず、BMC 投与群においては発症が認められず (Fig. 6)、また、MEMC よりも BMC の方が脳中へ蓄積し易い (Fig. 7) ことから、水俣病様症状の発現には水銀の脳中への蓄積量のみでなく、有機基の構造も重要であることが考えられる。

謝辞 本研究を行なうにあたり、多くの御助言を戴いた東京大学薬学部 浮田忠之進教授、東京理科大学薬学部 中井 正教授に深く感謝する。

9) 瀬辺恵鑑, 伊津野吉亮, 松本 哲, 松岡倫子, 赤星光善, 熊医誌, **35**, 1219 (1961).

10) U. Ulfvarson, *Intern. Arch. Gewerbepathol. Gewerbehyg.*, **19**, 412 (1962).

11) Y. Takeda, T. Kunugi, O. Hoshino, T. Ukita, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **13**, 156 (1968).

12) K. Nose, *Jap. J. Hyg.*, **24**, 359 (1969).