メチル水銀の神経毒性とその作用機構

三浦郷子

和光大学, 経済学部, 環境科学教室

Neurotoxic Mechanisms of Methylmercury

Kyoko MIURA

*Department of Environmental Sciences, Wako University,
2160 Kanai-cho, Machida-shi 195-0071, Japan*

(Received October 14, 1998)

The general population is exposed to methylmercury (MeHg) through a diet, especially fishes.

The ability of MeHg to easily pass through the biological membranes seems to be responsible for easily passing of MeHg through the blood brain barrier and the placental barrier. Thus, the accumulation of MeHg in the brain and in the fetus results in neurological disturbances and fetal impairments.

The neuronal damage caused by MeHg is almost exclusively limited to the central nervous system in the adult human. Furthermore, the areas of damage to the brain are highly localized. Little is known about the mechanism of the selective damage caused by MeHg in the nervous system. In this paper, many studies on the adverse effects of MeHg at the biochemical level were cited. The ability to accumulate MeHg and a low level of intracellular glutathione seem to make neuronal cells to susceptible to MeHg. By considering the high affinity of MeHg cations to SH groups, it appears reasonable that a large number of cellular functions are being affected. Effects of MeHg on protein synthesis, membrane functions and cytoskeletons are discussed. Recent evidence suggests that oxidative stress and/or apoptosis are involved in the neurotoxicity of MeHg. Cumulative data indicate that functions of microtubules and neuronal transmission are highly susceptible toward MeHg exposure *in vivo* and *in vitro*. In prenatal exposure, a possible mechanism of MeHg toxicity is that MeHg alters the brain architecture and decreases the brain size due to the depression of cell division and neuronal migration, perhaps through inhibition of the microtubule functions.

Key words — methylmercury; neurotoxicity; fetal impairment; microtubule disruption; glutathione; apoptosis

1. はじめに

水銀は紀元前 2000 年来中国で, 更に, 紀元前 400 年ころより既に医薬品として, ギリシャ, インド, ペルシャで利用されていたといわれているように人類におけるその利用は長い歴史

をもっている。¹⁻⁴⁾ その強い殺菌効果により昇汞（塩化第二水銀）は消毒剤として、また、水銀軟膏（金属水銀）は駆梅剤として用いられた。¹⁻⁴⁾ 有機水銀系医薬品は、殺菌剤、目薬、避妊薬、利尿剤として用いられた。⁴⁾ 第2次世界大戦後、我が国では、水銀系農薬として、酢酸フェニル水銀及びヨウ化フェニル水銀がイモチ病に大量に用いられた。⁴⁾

水銀及びその化合物による中毒は、水銀鉱山における職業中毒として始まり、その後、水銀の利用範囲が広まるにつれメッキ工場や電気及び化学工業などで、慢性あるいは亜急性中毒として現われる。一方、医薬品としての水銀剤の誤用や水銀系農薬使用時の不注意などでは急性中毒として現われた。現在では、水銀系農薬の生産は中止され、医薬品としての水銀使用もおこなわれておらず、これらが原因で水銀中毒にかかる機会は少なくなった。

一方、化学触媒として昭和30年代に塩化ビニール、酢酸ビニールなどの生産に塩化第二水銀が、アセトアルデヒド生産に硫酸水銀が多量に用いられた。水俣では、このアセトアルデヒド生産工程において触媒として用いられた硫酸水銀からメチル水銀 (MeHg) が生成⁵⁻⁸⁾し、廃水とともに水俣湾に排出された。海水中の MeHg は、生物濃縮により魚介類に蓄積され、それらを摂取することにより水俣病が発生した。その症状はアルキル水銀に特有のもので、他の水銀化合物による中毒には見られないような激しい脳神経症状を示した。水俣病発生以前における、アルキル水銀中毒は、Table 1³⁾に示すように、ジメチル水銀やヨウ化メチル水銀などを研究あるいは種子消毒に用いた例が報告されていた。

現在、人為的なアルキル水銀の環境中への排出は厳しく制限されている。しかし、既に環境中に多量に存在する水銀化合物から（主として微生物の関与により）MeHg が生成されることが証明^{9,10)}されており、依然として問題となっている。

水俣病の発生（1956）以来、MeHg の生体影響に関して様々な研究が行なわれ、動物を用いた実験の水俣病等の研究により臓器蓄積及び排泄等の体内動態、投与量と発症の関係、及び、病理像に関する多くの研究成果が報告されている。^{11,12)} しかし、MeHg の毒性発現の分子

Table 1. Early Cases of Alkylmercury Intoxication

Year	Chemicals	Occupation	Age (Sex)	Nationality	Remarks
1865	(CH ₃) ₂ Hg	Research Assistant	30 (M)	England	Died 11 days after intoxication
			23 (M)	England	Died 1 year after intoxication
1870	C ₂ H ₅ HgX	Farmer	—	Germany	
1940	CH ₃ Hg I	Seed Sterilizer	4 Persons	England	
1943	(C ₂ H ₅) ₂ Hg	Clerk	2 Persons	Canada	Hg 1 µg/m ³ in air, Died
1945	CH ₃ Hg I	Factory Worker	32 (M)	Sweden	Ataxia, Hypersensitiveness
1948	CH ₃ HgX	Research Assistant	25 (M)	Sweden	Died, 400 µg/l in Blood, 160 µg/l in Urine
1948	CH ₃ HgOH	Factory Worker	23 (M)	Sweden	Died, High conc. of Hg retained in brain and liver
1949	CH ₃ HgX	Farmer	55 (M)	Sweden	
1954	CH ₃ HgX	Seed Sterilizer	41 (M)	Sweden	Died, Hg 500 µg/l in Urine
1954	C ₂ H ₅ HgX	Farmer	60 (M)	Sweden	

(ref. 3)

レベルの機構や神経組織特異性を説明する機序についてはなお未解明の部分が多い。本稿では MeHg による神経症状及び病理像の特徴を概説した後、MeHg 及びエチル水銀など低級アルキル水銀による神経障害について作用機構に関する研究に焦点をしばり述べる。

2. MeHg の吸収、蓄積及び排泄

MeHg の体内動態は動物の種、系統、性、週令等によって異なり、多くの研究が報告されている。¹³⁻²³⁾ 詳しくはそれらの報告に譲り、ここでは MeHg の神経症状惹起作用を理解するうえで特に関係が深いと考えられる吸収、蓄積及び排泄についてのみ述べる。

経口摂取された MeHg はヒトの腸からその大部分（腸管吸収率は約 95%）^{11,12,24)} が体内に吸収される。排泄は大部分は糞便から、一部は尿及び毛髪から行われる。この間、かなりの割合の MeHg が肝臓から胆汁中に分泌されるが、その大部分は腸管から再吸収される。この現象は MeHg の腸肝循環と呼ばれ MeHg の生物学的半減期を 73²⁵⁾—76 日²⁶⁾ と長くする原因になっている。最近 (1994), ²⁰³Hg 標識した MeHg を健康成人男子（ボランティア）に静脈より投与した後、70 日間水銀の排泄を MeHg として測定した結果が報告された。²⁷⁾ これによると 1 日の排泄量が従来 1%^{11,25,26)} とされていたのに対し 1.6% でありその生物学的半減期は 45 日になるとしている。糞便に排泄される水銀の大部分は無機水銀であるが、MeHg も含まれており、その量は投与後 1—8 日の間は糞便中総水銀の 3.5%, 11—30 日の間は 2.3%, 36—71 日の間は 1.5% であり、尿中には MeHg は検出されていない。²⁷⁾

ラットを用いた実験によると、消化管に注入された MeHg は 2 時間以内に約 80% が吸収され、その吸収率は十二指腸、胃、回腸、空腸の順に高い。²⁸⁾ マウス、^{29,30)} ラット^{31,32)} 及びハムスター³³⁾ に投与された MeHg の臓器分布は肝臓と腎臓に最も高い。しかし脳にも徐々に蓄積する。²⁹⁻³²⁾ ラットに ²⁰³Hg 標識したエチル水銀（各組織への蓄積は MeHg と変らないことが明らかになっている）投与後、8 日間、経時的に臓器内水銀を測定すると、肝臓では水銀の濃度は投与後 48 時間まで増加した後減少に向かうが、腎臓では 8 日まで増加し続ける。脳も水銀の濃度が継続的に増加する。³⁴⁾ マウスでは、²⁰³Hg 標識 MeHg 投与後 1 日目に投与量の約 20% が腎臓に、約 10% が肝臓に蓄積した後、ともに減少するが、脳では 5 日目に蓄積量が

Table 2. Distribution of Mercury in the Brain from Monkey after Injection with ²⁰³Hg-ethylmercury

Area		Mercury concentration (Hg µg/g wet tissue)	
		60 min after injection (intravenous injection)	8 days after injection (peritoneal injection)
Cerebellum		0.214	1.22
Cerebral Cortex	Frontal lobe	0.170	1.39
	Temporal lobe	0.176	1.47
	Occipital lobe	0.213	1.68
Cerebral White Substance	Frontal lobe	0.064	1.16
	Temporal lobe	0.067	1.14
	Occipital lobe	0.068	1.10
Midbrain		0.188	1.24
Corpus Callosum		0.047	0.96

Monkey was injected with ²⁰³Hg-C₂H₅HgCl (800 µgHg/kg). (ref. 34)

Table 3. Organ Mercury Content of Human in Alkylmercury Intoxication

Reporter (Year)	Number of patients	Days after onset of symptoms	Hg ($\mu\text{g}/100\text{ g wet tissue}$)		
			Brain	Liver	Kidneys
Lundgren & Swensson (1948)	1	30	400—930	1410	300
Ahlmark (1948)	1	30	450—510	1960	3040
Höök <i>et al.</i> (1954)	1	21	1200	3900	2700
Takeuchi <i>et al.</i> (1960)	12	19—100	1070 ^{a)}	3810 ^{a)}	4610 ^{a)}
Tsuda <i>et al.</i> (1963)	1	21	3000	2100	5100
Okinaka <i>et al.</i> (1964)	1	13	1300—7900	8800—14000	—
Ordonez <i>et al.</i> (1966)	1	—	1500	2000	1800
Hiroshi <i>et al.</i> (1967)	1	40	1300	—	1300
Hiroshi <i>et al.</i> (1967)	1	126	1100	3600	4700

a) Average value of 12 patients. (ref. 35)

最大になる。¹⁷⁾ サルに投与した²⁰³Hg 標識エチル水銀の脳内各部における水銀の蓄積は Table 2 に示すように大脳皮質後頭葉に高く、時間的に見ると 4 日目より 8 日目の方が高い。また、水銀の濃度は白質より皮質及び小脳に高くなっている。³⁴⁾ このことは低級アルキル水銀によって中毒したヒトにおいて、常に後頭葉、特に視覚皮質に強い傷害を受けていることと関連があると考えられている。Table 3 にヒトのアルキル水銀中毒症の臓器内水銀値³⁵⁾を示した。この結果からも、肝臓と腎臓での水銀レベルは脳内レベルより高いことが分かるが、水俣病の障害は神経系、ことに脳の傷害が顕著であることから脳における水銀値が重要であり、これまでの報告によるとヒトの脳への MeHg の蓄積が $1\text{ }\mu\text{g/g}$ 湿重量あれば発症するとされている。³⁾

魚介類を摂取して取り込まれる水銀化合物のうち、血液脳関門を通過して脳内に入る水銀のほとんどは有機水銀の MeHg であると考えられている（水銀蒸気、 Hg^0 は血液脳関門を容易に通過し、脳組織で酸化されて無機の形で蓄積されることが知られている³⁶⁾）が、水俣病例の臓器水銀値を測定した結果によると、総水銀値はそのまま MeHg 値を表わしていない。³⁾ これについては測定方法の問題も考慮する必要があるが、脳内での MeHg の無機化が考えられている。実際、*in vitro* の実験で、動物の肝臓、^{37,38)} 腎臓、^{37,38)} 脳^{37,38)} 及びヒト胎児肝臓³⁹⁾ には MeHg を無機化する能力が示唆されている。Table 4⁴⁰⁾ は水俣病重症長期経過例の臓器水銀値を急性例と比較したものである。総水銀に対する MeHg の割合は急性例で長期経過例に比べ高くなっていることから、時間経過に伴って無機化された水銀が増加すると考えられる。さらにこの Table から、急性例が肝臓と腎臓に総水銀の蓄積が著しいのに対し、長期経過例では脳への蓄積の割合が高いことが分かる。これは脳/肝、脳/腎の比率によってはっきり示され、水銀の排出が、肝で最も早く、次に腎であり脳ではきわめて遅いことを示している。武内と衛藤⁴⁰⁾ はヒト解剖例から、ヒト脳における水銀の生物学的半減期を約 240 日と計算し、全身からのそれより長期間を要し、脳に残留しやすいとしている。

先にもふれたが、ヒト及び哺乳動物の体内で、MeHg は無機水銀に分解されることを示す報告は多い。⁴¹⁻⁴⁴⁾ この無機化された水銀は排泄され易いため、体内蓄積量を減少させる重要な要因と考えられている。腸内細菌による分解^{45,46)} はよく知られているが、無菌動物^{47,48)} にお

Table 4. Total Mercury and MeHg Levels in Organs of a Prolonged (18 years) Patient and an Acute (96 days) Patient

Organ		Total Hg ^{b)} (μg/g wet tissue)		MeHg (μg/g wet tissue)	
		Prolonged Patient ^{a)} 18 years	Acute Patient 96 days	Prolonged Patient ^{a)} 18 years	Acute Patient 96 days
Cerebrum	Cortex	2.785	7.36	0.035	2.34
	Medulla	1.762	—	0.043	—
Cerebellum		4.237	8.78	0.063	2.95
Liver		2.399	84.3	0.055	6.80
Kidneys		5.585	62.4	0.064	9.67
Brain/Liver×100		122	9.5	86	38.8
Brain/Kidney×100		52	12.9	73	27.5

a) The patient died 18 years after the onset of symptoms. b) Total mercury: atomic absorption spectrophotometry, MeHg: gas chromatography. (ref. 40)

いても生体内で MeHg が無機化をうける。Suda ら⁴⁹⁻⁵³⁾は動物体内でのアルキル水銀の無機水銀への分解に体内に広く分布している活性酸素が関与していることを証明した。食細胞(好中球, 単球, マクロファージ及び好酸球) にその作用が強く肝細胞にもその活性を認め, 活性酸素種としては, $\cdot\text{OH}$ 及び HOCl をあげている。

3. 中毒症状及び神経系病変

MeHg は曝露の量や期間等に依存して, 障害を起こす器官や機能が異なりその程度も広い範囲で変化するいわゆる全身的な毒性を持つ化学物質である。しかし, 水俣病に特徴づけられるように主な標的器官は神経系^{11,12)}といえる。1957—1960 年の水俣病発生当初の典型例における症状は口の周囲や四肢末端のしびれ感及び感覚鈍麻, 運動失調, 振戦, 言語障害, 求心性視野狭窄, 難聴などである。^{54,55)} それに対し, 1986—1995 年の 10 年間に熊本県で水俣病に認定された患者 (80 人) の神経症状の特徴は, 典型例に比べ, 視野狭窄, 聴力障害, 小脳症状などの中核神経症候の出現頻度が低くなり症状の程度も軽い傾向がある。⁵⁶⁾ 一方, 表在知覚障害はほぼ全例でみられる。⁵⁶⁾ Table 5 にヒトの水俣病の症状出現頻度を典型例及び最近の認定例について示した。このうち運動失調, 歩行異常, 四肢反射の異常, 末梢感覚障害, 感覚鈍麻などは動物においても観察され, ネコ⁵⁷⁾及びサル⁵⁸⁻⁶⁰⁾では視覚障害や振戦が認められる。ラット⁶¹⁾では後肢屈曲交差及び後肢麻痺などを典型的症状とする。

ヒトの病理像において典型的な例では, 神経系の病変は中枢優位に現れ, 末梢の方が軽度である。⁶²⁻⁶⁴⁾ しかし, 軽症者の場合は軽度の中枢神経病変に加えて知覚神経末梢優位の病変としてみられる。

Hunter と Russell⁶³⁾は, 23 歳で発病し 15 年を経過して死亡した慢性例の MeHg 中毒症例を報告し, これが水俣病の解明に大きく貢献した。その報告によると, 大脳皮質では後頭葉視覚領皮質の前位部が限局的に, 頭頂部では前後両中心回皮質がおかされている。その特徴は皮質神経細胞の顕著な減少と残存細胞の萎縮である。小脳では深部小葉の皮質が広範に傷害されている。そして顆粒層の神経細胞の傷害が Purkinje 細胞のそれを顕著にうわまっている。

Table 5. Frequency of Symptoms Observed in Minamata Disease

Symptoms and Signs		Frequency (%)		
		Kumamoto (1960) (34 patients)	Niigata (1965) (26 patients)	Kumamoto (1986—1995) (80 patients)
Central constriction of visual fields		100	33	52
Censory disturbances				
	Superficial	100	92	98
	Deep	100	38	57
Ataxia	Adiadochokinesis	94	23	48
	Writing disturbance	94		
	Difficulty buttoning	94		
	Clumsy finger-to-nose test	81	41	38
	Romberg's sign	43	9	25
	Dysarthria	88	35	17
Hearing disturbances		85	69	68
Gait disturbances		82	31	36
Difficulty tandem walking				65
Intention tremor		76	26	18
Extrapyramidal signs		9—21	14	
Deep reflex	Exaggerated	38	17	
	Diminished	9	14	
Pathological reflex		12	14	
Paralysis		3	9	
Autonomic disturbances		24	5	
Mild mental disturbances		71	16	
Convulsion			4	
Knee-to-heel test				55—60
Shin-tapping test				55—60

(refs. 54—56)

武内ら⁶⁵⁾の記載による典型例(急性亜急性期の12例を含む72剖検例)の脳では、皮質が優位に傷害され、かつ後頭葉の傷害が強い。特に視覚中枢傷害が著しい。皮質傷害は第2層、第3層表層に顕著であるが、おおむね全層に生じる。病変の特徴は神経細胞の変性による脱落消失である。病変の程度変化の幅は広く、皮質第I—第VI層における傷害の程度により6段階(第1度の傷害から第6度の傷害)に分けられるとしている。

小脳では病変分布は症例により変化があるがその特徴は顆粒層神経細胞の脱落消失である。⁶⁵⁾ この場合も傷害の程度により6段階に分けられるとしている。水俣病に特徴的な病変が第4度—第1度の傷害に認められる。すなわち、第4度の傷害では顆粒細胞はほとんど全部脱落しているが、Purkinje細胞は保存されているか、その遺残が認められる。第1度の傷害では顆粒細胞の減数がわずかでsingle cell necrosisである。

脳幹と脊髄では一般に著明な病変は認められない。

脳神経末梢では傷害は軽い。脊髄末梢神経では脳、小脳と比べると軽度ではあるが常に

傷害が認められ、知覚神経優位の傷害が観察される。

他の臓器では腎に尿細管傷害が認められる他、肝臓、脾臓及び膵臓などにおいても傷害が観察されるが神経系に比べるとその程度ははるかに軽い。

水俣病軽症例（1984年までに熊本で剖検されたもの）については武内と衛藤⁶⁶⁾は次のようにまとめている。大脳皮質の神経細胞の減少は少なく30%以下（第1度の傷害に相当）であり、病変は鳥距野に強く、中心後回、中心前回、横側頭回及び第18野にも認められる。しかし、それ以外の皮質の変化はわずかである。小脳では、顆粒細胞の減数がわずかでPurkinje細胞の配列の乱れからBergmann gliaの増生が認められる（第1度の傷害に相当）。脳幹と脊髄には変化はない。末梢神経では、全例において後根神経線維が特に腰部で軽度傷害されていたのに対し、前根神経線維は12例中6例のみに傷害が認められた。

このように低級アルキル水銀（MeHg及びエチル水銀）中毒による神経系の病変は、急性、亜急性、慢性に経過したか、また、軽症であるか重症であるかによりその病変分布及び性状ともに多様である。しかし、イラクにおけるMeHg中毒事故（1972）⁶⁷⁾ ルーマニアにおけるエチル水銀中毒例（1974）⁶⁸⁾及びアメリカにおけるMeHg中毒例（1969）⁶⁹⁾においても、程度は様々であるが上記水俣病に示した特徴的な病変のいずれかが観察される。

胎児が母体を通じて発生期及び胎生期にMeHgに暴露されると大脳低形成等による精神障害及び運動障害を示し、症状の軽重の差により知能障害、原始反射、小脳症状、身体発育停止、栄養障害、流延及び斜視などが出現する。⁷⁰⁾ 胎児性水俣病の脳は、一般に小さくなりやすく、重量も正常に比し著しく減少する。大脳皮質では神経細胞も未熟の状態中小型が多く神経細胞の配列の乱れもあり、その数も少ない。小脳では顆粒細胞層の神経細胞減数による菲薄化が生じている。脳幹、脊髄では顕著な変化はなく、末梢では知覚神経優位の障害があり髄鞘の無形成、低形成が成人例より顕著である。^{71,72)}

4. 神経毒性発現機構

4.1. 脳へのMeHgの蓄積機構 MeHg摂取により中枢神経系に傷害が現れることは作用量のMeHgが脳に取り込まれることを意味する。MeHgは無機水銀と異なり血液脳関門（BBB）を容易に通過し摂取後徐々に脳組織に蓄積する。⁷³⁾ このことが中枢神経傷害を引き起こす大きな要因とされている。化学物質のBBB透過性はその物質の脂溶性により影響を受けることが知られている。⁷³⁾ MeHgを含む低級アルキル水銀化合物は脂溶性が高く、⁷⁴⁻⁷⁷⁾ その性質により容易にBBBを通過すると考えられている。一方、MeHgの一部がシステインあるいはグルタチオン（GSH）と結合した水溶性の複合体として肝臓、⁷⁸⁾ 血液^{79,80)} 及び脳⁸¹⁾に存在することから水溶性の低分子SH化合物複合体の形で脳に輸送される可能性も検討された。平山^{82,83)}はラットにMeHgを静脈内投与する際、L-システインと同時に投与するとMeHgの脳への取り込みが増加し、この効果はD-システインでは認められないことを報告した。続いて、AschnarとClarkson⁸⁴⁾はL-システインによるこのMeHg取り込み増加がメチオニンによって抑制されることを見出した。彼等は、MeHgとシステインの複合体（MeHg-L-システイン）が中性アミノ酸のメチオニンに類似しているため同じ輸送系を使用すると仮定し、実際にウシ脳毛細血管内皮細胞を用いた実験で、MeHg-L-システインがメチオニンなどの中性アミノ酸の輸送系であるL-システムを通過することを証明した。⁸⁵⁾ この現象はラットを用いた*in vivo*の実験でも確かめられた。⁸⁶⁾ すなわち、Me²⁰³Hg-L-システ

インを投与した際の ^{203}Hg の脳への輸送はL-システムの基質であるメチオニン及びアミノ酸アナログである2-aminobicyclo-[2,2,1]heptane-2-carboxylic acid (BCH) によって抑制されたがアラニン-システムの基質によっては抑制されない。またL-メチオニンの輸送はMeHg-L-システインによって抑制されるが塩化MeHgによっては抑制されない。さらに, Me ^{203}Hg -GSHとして投与された ^{203}Hg の取り込みはL-メチオニンとBCHにより抑制されたがD-メチオニンによっては抑制されないことを明らかにした。これらの結果からMeHgはシステインとの複合体として脳に取り込まれ, その際, MeHg-GSHがMeHg-L-システインの供給源になっているとしている。

4.2. 神経毒性発現機構 a. 細胞のMeHg感受性——MeHgの標的臓器は神経系であり, 病変は中枢優位にあらわれ, その特徴は神経細胞の変性による脱落消失である。特に小脳顆粒細胞が傷害を受けやすい。したがって, その毒性発現は4.1で取り上げたように第一に脳へのMeHgの移行しやすさと蓄積に起因している。しかしそのほかに脳組織のなかでも神経細胞が特に傷害を受けやすい特徴を有しており, かつ, 成人水俣病にみられる脳病変の顕著な局在性を考えるなら神経細胞の種類によっても, あるいは神経細胞がおかれている生理的環境によってもMeHgに対する感受性が異なることが予想される。

SagerとSyversen^{87,88)}は3種の培養細胞を用いてMeHgに対する感受性を比較し, 神経細胞由来のニューロblastoma細胞がグリオーマ及びファイブロblast細胞より高い感受性を示し, その原因が他の2細胞種よりMeHgの蓄積量が高いことによることを報告した。一方, MiuraとClarkson⁸⁹⁾はMeHgの蓄積量と細胞のMeHgに対する感受性の関係を明らかにするためMeHgに対する感受性が段階的に異なる細胞株を神経様培養細胞であるPC12細胞で樹立し実験に用いた。親株(PC12)と比較してMeHgに対し1.4—10倍の耐性を持つ7株(PC12/TM系)のMeHg蓄積量はMeHgに対する耐性度と有意な負の相関を示した(Fig. 1)。⁸⁹⁾すなわち, MeHgを蓄積しやすい株ほどMeHgに対し高い感受性を示した。⁸⁹⁾この高い感受性はMeHgの取り込みの初速が速いにもかかわらず, 一旦細胞内に取り込んだMeHgを排出する能力が弱いことに起因することが明らかになった。^{89,90)}その結果, MeHgに対し感受性の高い株ほどMeHgを排出する力が弱いという負の相関が成立した(Fig. 2)。これらの結果とSagerとSyversenの報告とを考え合わせると神経細胞はMeHgを蓄積しやすいためにMeHgに対し感受性が高く,⁸⁷⁻⁹⁰⁾蓄積しやすさは取り込みやすいが排出しにくい性質によることが示唆された。⁸⁹⁾

Fig. 1. Correlation between Sensitivity of PC12 Sublines (PC12/TM Series) to MeHg (IC₅₀) and MeHg Accumulation

IC₅₀ was measured by colony forming assay in the presence of MeHg for 10 days. Accumulation of MeHg for 60 min in the presence of 5 μM MeHg at 37°C (refs. 89 and 90).

Fig. 2. Efflux of MeHg from PC12 Sublines (PC12/TM Series) (A) and Correlation between Sensitivity to MeHg (IC₅₀) and MeHg Efflux (B)

IC₅₀ was measured by colony forming assay in the presence of MeHg for 10 days. Cells were preincubated with 5 μM MeHg for 60 min, then washed and reincubated in fresh medium for additional 60 min. MeHg retained in cells was measured after the reincubation for 60 min in fresh medium (ref. 89).

細胞の MeHg 排出能力が細胞への MeHg の蓄積量を決定する重要な要因であるという上記の結果は細胞の GSH 含量の測定を促した。従来より GSH は MeHg の体内動態, 特に肝臓から胆汁への排泄において極めて重要な役割を果たしていることはよく知られている。⁹¹⁻¹⁰⁰ そこでは, MeHg は MeHg-GSH 複合体として担体を介して輸送されると考えられている。担体として肝臓に発現している GSH 抱合体を輸送する canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT) の研究が進んでいるが, MeHg-GSH 複合体が, その輸送系により輸送されるという直接的な証明はまだない。一方, 神経組織及び細胞レベルにおける MeHg の排出に関する研究はほとんどない。Miura と Clarkson⁸⁹)によって樹立された MeHg に対する感受性が異なる細胞株の GSH 含量を測定すると, 最も MeHg に対し高い耐性を示す PC 12/TM 細胞は親株の約 4 倍の GSH 含量を示し, 測定した 8 株の細胞株の間で GSH 含量が高い細胞株ほど MeHg に対し高い耐性を示すことが明らかになった。¹⁰¹ さらに GSH 合成抑制剤である buthionine sulfoximine (BSO) を培地に添加して細胞内 GSH レベルを低下させると MeHg に対する感受性も高くなる (Fig. 3)。¹⁰¹ これらのことから, 細胞内 GSH 含量が細胞の MeHg に対する感受性を決定する一つの要因であることが確かめられた。しかし, この細胞株 (PC 12/TM) を BSO で処理して細胞内 GSH レベルを低下させても MeHg の蓄積量は変化しない¹⁰¹)ことから, この細胞では GSH は MeHg の排出に関係しているというよりは細胞内で MeHg に結合することによって細胞毒性を軽減していると考えられる。

Verity と Sarafian¹⁰²)はラット小脳から分離した小脳顆粒細胞とグリア細胞の細胞内 GSH 含量を測定し, 小脳顆粒細胞で有意に低いこと, さらに BSO で処理して細胞内 GSH レベルを低下させると MeHg によっておこる脂質の過酸化が増大することを示した。種々の組織由来の培養細胞における細胞内 GSH 含量を測定してみると, ここでも細胞内 GSH 含量が

Fig. 3. Effect of Intracellular GSH Levels on the Sensitivity of PC12 and PC12/TM Cells to MeHg

Cells were preincubated with BSO (0.2 mM) for 3 h, washed and reincubated in BSO-free medium with or without MeHg for 24 h (ref. 101).

Table 6. Levels of GSH and Sensitivity to MeHg (IC_{50}) in Various Kind of Cell Lines

Cell line	GSH (nmol/mg protein)	IC_{50} for MeHg (μM)
PC12	6.1 ± 0.15	6.9 ± 0.9
PC12/TM	25.6 ± 1.14	52.5 ± 12.8
PC12 h	7.5 ± 0.74	12.8 ± 4.1
Colon 26	26.1 ± 0.74	37.5 ± 15.5
Glioma	32.7 ± 4.25	31.5 ± 12.0
HeLa	57.9 ± 3.38	64.9 ± 13.6
L	21.4 ± 1.48	26.6 ± 9.2
Ltk-	29.0 ± 1.03	35.2 ± 24.1
Neuroblastoma	25.3 ± 0.30	13.2 ± 6.6

The sensitivity of each cell line to MeHg was measured by MTT assay, after 24 h incubation with various concentrations of MeHg. Each value is the mean of four determinations and the standard deviations were presented (ref. 101).

高い細胞種ほど MeHg に対し耐性であることが判明した。¹⁰¹⁾ さらに興味あることには、測定された細胞種のなかで神経細胞由来 (ニューロblastoma) 及び神経様細胞 (PC 12, PC 12 h) では GSH 含量が低く、かつ、MeHg に対する感受性が高いことが明らかになった (Table 6).¹⁰¹⁾ これらの結果は神経細胞が MeHg の蓄積性や細胞内因子などで他の組織由来の細胞とは異なる特性を有し、そのことが MeHg に対し高い感受性を示す原因になっていることを強く示唆している。成人水俣病

にみられる脳病変の顕著な局在性は神経細胞の種類によってそれらの因子が異なる可能性を示しているのかもしれない。これらはすべて、今後解決されなければならない問題として残されている。

b. MeHg の細胞内標的の検索 —— 細胞に取り込まれた MeHg が細胞のいかなる構造及び機能に障害を引き起こすかに関しては多くの研究がなされてきた。^{11,12,74)} 脳における蛋白質合成はラットを用いた実験で MeHg により神経症状が発現する前に顕著に低下すること、¹⁰³⁻¹⁰⁹⁾ 及び、電子顕微鏡観察により粗面小胞体の形態変化¹¹⁰⁻¹¹²⁾が認められたことから MeHg の作用点として早くから注目された。MeHg を投与されたラットの脊髄後根神経節でも蛋白質合成の抑制と粗面小胞体の形態変化が報告されている。¹¹³⁻¹¹⁵⁾ その一方、脳において蛋白質合成が促進されるという報告もある。¹¹⁶⁻¹¹⁸⁾

Syversen¹¹⁹⁾はラット小脳顆粒細胞の蛋白合成阻害が継続的に観察されたのに対し、Pur-

kinje 細胞及び大脳の神経細胞では一時的に止まることから、小脳顆粒細胞は他の細胞に比べ回復能力が劣るのではないかと考察している。しかし、RNA 合成が蛋白質合成と同時にそれより早い時期に抑制されることから、蛋白質合成が特に MeHg に対し感受性が高いという考えに疑義を述べた。それに対し、Sarafian ら¹²⁰⁾は胎仔ラット小脳顆粒層から分離した 80—90%が顆粒細胞から成る系を用いて、MeHg の蛋白質合成に対する影響を検討した。その結果、MeHg は RNA 合成、ミトコンドリア、細胞内 ATP レベル及び細胞内 Na^+ 、 K^+ レベルに顕著な影響を与えずに蛋白質合成を 50%抑制することを報告している。蛋白質合成のどの段階が最も阻害されやすいかについてはリボゾーム 60 S サブユニット、¹²¹⁾ tRNA、¹²²⁾ エロンゲイションファクター、¹²³⁾ リボヌクレアーゼ¹²⁴⁾及びリボヌクレアーゼインヒビター¹²⁴⁾などが影響を受けるという報告がある。ラット胎仔の場合、フェニルアラニン-tRNA のアミノアシル化が高い感受性を有することが報告¹²⁵⁾されたが、成熟ラット脳で tRNA の種類によりアミノアシル化が抑制されるものと促進されるものがあることが分かった。¹²⁶⁾ また蛋白質の種類により合成が促進されるものと抑制、あるいは不変化のものが存在する¹²⁷⁾ など MeHg の蛋白質合成阻害と神経毒性発現との関係は必ずしも明らかではない。

MeHg の細胞内標的を見い出すため、培養細胞を用いて、細胞のいろいろな機能に対する影響を検討すると Table 7^{128—134)}のような結果が得られる。比較のため無機水銀の影響も同時に示してある。培地に添加された MeHg は $2\text{ }\mu\text{M}$ で細胞増殖を 50%抑制し、無機水銀の 10—20 μM に比べ増殖抑制濃度で約 10 倍毒性が強い。この濃度の MeHg で処理された細胞について処理時間 1 時間という初期における変化をみると、DNA、RNA 及び蛋白質合成等は全く影響を受けず、膜のバリアー能を示す 2-デオキシグルコースの遊離も生じない。それに対し微小管ネットワークが速やかに消失する。一方、無機水銀の場合には、MeHg よりは 10 倍高い増殖抑制濃度で DNA、RNA、蛋白質合成及び膜のバリアー能のいずれもが著しく

Table 7. Comparison of Cytotoxic Effects of Methylmercury and Mercuric Chloride in Mouse Glioma Cells

Cytotoxic effects	Time	Concentration (M)		References
		CH_3HgCl	HgCl_2	
Cell growth (50% inhibition)	46 h	2×10^{-6}	$1-2 \times 10^{-5}$	128, 129
DNA synthesis (50% inhibition)	1 h	$2-5 \times 10^{-5}$	$2-5 \times 10^{-5}$	130
RNA synthesis (50% inhibition)	1 h	$2-5 \times 10^{-5}$	$2-5 \times 10^{-5}$	130
Protein synthesis (50% inhibition)	1 h	$1-5 \times 10^{-5}$	$1-5 \times 10^{-5}$	131
Cell free protein synthesis (50% inhibition)	10 min	10^{-4}	10^{-5}	131
Disappearance of microtubule networks	1 h	$2-5 \times 10^{-6}$	Above 5×10^{-5}	132, 133
Tubulin polymerization <i>in vitro</i> (50% inhibition)	15 min	2.5×10^{-5}	10^{-5}	132, 133
Release of 2-deoxyglucose	15 min	Above 2×10^{-5}	Above 2×10^{-5}	134

阻害され、微小管も障害される。この MeHg の微小管に対する作用は電子顕微鏡観察によって分裂期細胞の紡錘体の消失として観察された。¹²⁸⁾ この場合、微小管が完全に消失しているのに他の細胞内小器官には変化が認められないことも確認された。^{128,133)} アルキル水銀が分裂装置に作用することは、1969 年頃より示唆されていた¹³⁵⁻¹³⁷⁾が、この研究により、電子顕微鏡観察で微小管構造の破壊が直接証明された。¹²⁸⁾ Table 7 に示された一連の研究により、細胞の他の機能、特に、従来より水銀化合物の主要な標的として細胞レベルで検討されてきた高分子合成活性 (DNA, RNA 及び蛋白質合成)^{131,138-142)}に影響を及ぼさない低濃度の MeHg で微小管が特異的に破壊されることが明確になり、微小管が MeHg の細胞内標的として位置づけられた。

微小管の構成蛋白質であるチューブリンは二量体当たり 15 個の SH 基を持ち、このうち 2 個の SH 基が SH 試薬によりブロックされると重合能力を失うことは良く知られていた。¹⁴³⁾ところが、MeHg では 15 個のうち 1 個がブロックされただけで重合が阻害された。¹⁴⁴⁾なおカドミウム、銅及び三価クロム等も *in vitro* のチューブリン重合を阻害するが、これらの化合物の細胞増殖抑制濃度では無機水銀と同様、微小管ネットワークに影響を与えなかった。^{132,133)} このようにチューブリン蛋白質に直接作用させた場合と細胞に与えた場合における作用の差は、細胞膜の存在によると考えられる。無機水銀と MeHg を比べると細胞への取り込みは MeHg において速やかである。¹³⁴⁾したがって、MeHg では低濃度で細胞膜のバリアー能に影響を与えることなく速やかに細胞内に取り込まれ微小管を特異的に破壊し、細胞増殖を抑制する。一方、無機水銀は細胞膜のバリアー能に影響を与えて、¹³⁴⁾ 多量に細胞内に侵入し、¹³⁴⁾ 種々の細胞内小器官に強い影響¹²⁹⁾を及ぼすと考えられる。

MeHg による微小管傷害は細胞周期分析によっても裏付けられた。¹⁴⁵⁾ Vogel ら¹⁴⁵⁾は MeHg 存在下でファibroblast 様細胞株、82-6 の細胞周期を分析し、G₁期が長くなること、及び G₂/M 期細胞の蓄積を観察した。これに対し、Zucker ら¹⁴⁶⁾は S 期細胞の増加を認め、DNA 合成阻害が主要な影響であると主張したが、その後、Ponce ら¹⁴⁷⁾により、より低い濃度で G₂/M 期細胞の蓄積が生じ、S 期細胞の増加はより高い濃度で起こることが証明され決着した。Vogel ら¹⁴⁵⁾は G₁期の延長は S 期に必須の蛋白質合成の抑制であり、G₂/M 期細胞の蓄積は分裂装置の障害であろうと考察している。

MeHg 添加後の細胞内微小管ネットワークの消長は細胞内に取り込まれた MeHg 量に依存している。^{87,88,148)} 培地にシステインあるいは GSH 等の SH 化合物を添加することにより、細胞内 MeHg 濃度が低くなると、その程度に依存して再び微小管ネットワークが出現する。^{148,149)}

その後、MeHg による微小管ネットワークの消失 (微小管脱重合) によって生じたチューブリンプールの増大が、コルヒチンの場合^{149,150)}と同様に、新たなチューブリン合成を阻害することも証明された。^{151,152)} このようにして微小管構造が破壊され、かつチューブリン合成が抑制された細胞は細胞内小器官の変性¹³³⁾が進行し、やがて細胞死に至る。

分化した神経細胞の軸索には多量の微小管が存在し軸索流及び神経刺激の伝達に必須の構造とされている。したがって、MeHg による微小管破壊はその神経細胞の機能並びに生存に多大な影響を及ぼすことが予想される。事実、Abe ら¹⁵³⁾はカエルの坐骨神経節に投与した MeHg によりアミノ酸の軸索内輸送が阻害されることを報告している。しかし、技術的な困

難もあり MeHg によって生じる成人脳の神経細胞変性脱落と微小管破壊の関係は未だ明らかにされていない。

最近, MeHg による神経細胞死はアポトーシスであることが初代培養した小脳顆粒細胞¹⁵⁴⁾ 及び *in vivo* の系¹⁵⁵⁻¹⁵⁷⁾ で証明された。培養細胞の PC 12 細胞でも MeHg によってアポトーシスが誘発される。¹⁵⁸⁾ アポトーシス誘導が MeHg のいかなる細胞機能に対する作用に関係しているかは、今後の大きな課題である。中川ら¹⁵⁸⁾ は MeHg によるアポトーシス誘発が微小管の特異的阻害剤であるコルヒチン、ビンブラスチン、タキソールと類似することから MeHg の微小管に対する作用が最終的にアポトーシス誘発につながると考察している。

神経細胞特有の機能に対する MeHg の作用を検討する試みは神経刺激の伝達,¹⁵⁹⁻¹⁶⁶⁾ 神経細胞膜の脂質成分,^{167,168)} 脳の毛細血管におけるアミノ酸の輸送,¹⁶⁹⁾ BBB におけるグルコース輸送,¹⁷⁰⁾ 視神経におけるアミノ酸の軸索輸送¹⁷¹⁾ あるいはアデニレートシクラーゼ活性¹⁷²⁾ 等について行われている。これらの細胞機能に対する影響と神経毒性の関係ははっきりしないが、神経筋接合部におけるアセチルコリン伝達への干渉¹⁷³⁻¹⁷⁹⁾ はイラクのアルキル水銀中毒でみられた筋力低下の原因と考えられている。これまでの研究で、MeHg はミトコンドリアによる Ca^{2+} 取り込みを阻害することによりアセチルコリンの漏出を導き、微小興奮性シナプス後電位の出現頻度を増加させ、一方で、刺激誘発性終板電位の発生を抑制することが明らかにされた。¹⁷⁹⁾

MeHg が神経細胞に傷害を与える際の分子種に関する研究は少ない。一般に、MeHg は SH 基に対する親和性が高いことから生理活性分子の SH 基ブロックによる傷害と考えられているが、最近、酸化的傷害の可能性も考えられている。Lebel ら¹⁸⁰⁾ 及び Lebel と Bondy¹⁸¹⁾ は、MeHg に曝露されたマウス脳で活性酸素が産生されること、また抗酸化剤がその活性酸素産生を抑制することを報告している。抗酸化剤が MeHg によって引き起こされる小脳顆粒細胞の脂質過酸化を軽減するという報告もある。¹⁸²⁾ Usuki と Ishiura¹⁸³⁾ は筋芽細胞を MeHg で処理すると活性酸素が産生されアポトーシスが誘発されること、および、このアポトーシスが抗酸化剤によって抑制されることを証明している。従来より、MeHg 投与による動物の体重減少や神経症状が抗酸化作用を持つビタミン E やセレンによって軽減される¹⁸⁴⁻¹⁸⁶⁾ ことは良く知られている。また培養細胞に対する毒性もビタミン E により軽減される。^{187,188)} セレンの作用の一つは過酸化反応消去酵素のグルタチオンペルオキシダーゼの構成成分としての働きと考えられている。Ganther¹⁸⁹⁾ はビタミン E は生体内で MeHg から生じたラジカルのスキャベンジャーとしてはたらき、セレンは MeHg と複合体を形成して不活化すると推論している。

c. 発育中の脳に対する MeHg の作用——発育中の神経組織は成人の神経組織に比べ MeHg に対する感受性が高い。^{11,12,190-193)} ヒトに神経傷害を引き起こす危険性が 5% である毛髪水銀量は、成人の場合は $50 \mu\text{g/g}$ であるのに対し、胎児の場合は $10-20 \mu\text{g/g}$ (母親の毛髪水銀量) という低い値になっている。¹²⁾

発育中脳の低形成は MeHg によって起こる胎児性水俣病の特徴的な病理像である。¹⁹⁴⁾ Choi ら¹⁹²⁾ は胎仔脳における神経細胞の遊走が阻害され脳の神経細胞層形成が不十分の状態であること、また、Purkinje 細胞の樹状突起の形成が不十分であること、さらに、神経細胞間の相互認識や細胞間基質の認識に異常¹⁹³⁾ が起こっていることを報告している。

Sager ら¹⁹⁵⁾及び Rodier ら¹⁹⁶⁾は発育中のマウスの脳（胎仔脳及び新生仔脳）における神経細胞の細胞分裂に対する MeHg 曝露の影響を調べた。既に種々の培養細胞で細胞骨格及び細胞分裂装置を形成する微小管が MeHg によって特異的に破壊される^{87,128,132,133,148)}ことが証明されていたことから、彼等は神経細胞が増殖中の脳の特定の部位における分裂像に対する MeHg 曝露の影響を注意深く検索した。その結果、培養細胞で得られたと全く同様の細胞分裂阻害像を見出した。すなわち、M 期に入る細胞数は変化しないが M 期から G₁期へ移行する細胞数が減少し M 期細胞数が有意に増加していることを認めた。現在では、これが胎児性水俣病における神経細胞数の減少による脳重量低下の原因の一つと考えられている。このように MeHg は脳の発育において、最も重要な神経細胞の増殖及び神経細胞層の形成という複数の過程に決定的な影響を及ぼしている。そして、WHO の報告¹²⁾は Choi ら^{192,193)}によって見出された神経細胞層形成の阻害及び Sager ら¹⁹⁵⁾によって証明された神経細胞分裂の阻害が MeHg による微小管の破壊あるいは重合阻害という共通の標的への作用の結果であると結論している。

5. おわりに

MeHg による神経症状の発現は、MeHg が脳へ移行しやすく、かつ脳に長期間滞留することと深く関係している。したがって、脳への移行機構への干渉要因や排出機構など、今後さらに検討すべき問題であろう。また、今回はほとんど触れることができなかったが、MeHg の毒性発現を大きく左右することが知られているセレン¹⁹⁷⁻²⁰²⁾やビタミン E^{184,203-205)}等の作用機構の研究も望まれる。この他に、高度に分化した神経細胞が持つ特有の性質が MeHg に対する感受性を高めている可能性がある。従来より MeHg が多くの酵素、構造蛋白質及び種々の細胞機能に影響を及ぼすことが報告されてきたが、^{11,12,74)} 今なお、それらの影響のどれが神経症状と関係するかを特定するのは困難である。最近、シナプスにおける神経伝達物質の伝達における種々の反応や酸化ストレスに対する感受性など神経細胞機能との関係で新しい研究が行われる傾向も出てきた。近年における脳研究の進展、及び、金属化合物の膜輸送系の研究が刺激となってさらに作用機構解明が進むことを望んでいる。

謝辞 本総説をまとめるにたり、東北大学教授の永沼 章博士、国立水俣病総合研究センターの衛藤光明博士、安武 章博士および臼杵扶佐子博士から大変有益な御助言をいただきましたことを記し、ここに深く感謝致します。

References

- 1) WHO, "Environmental Health Criteria 118: Inorganic Mercury," World Health Organization, Geneva, 1991, p.114.
- 2) Berlin M., "Handbook on the Toxicology of Metals," Elsevier Science Publisher B.V., Amsterdam, 1986, p.387.
- 3) Arima S.(ed.), "Minamata Disease," Seirinsha, Tokyo 1979.
- 4) Kitamura S., Kondo M., Takizawa Y., Fujii M., Fujiki M., "Mercury," Kodansha Scientific, Tokyo, 1976, p.426.
- 5) Uchida M., Hirakawa K., Inoue T., *Kumamoto Medical J.*, **14**, 171 (1961).
- 6) Irukayama K., Kai H., Konso T., Fujiki M., *Jpn. J. Hygiene*, **116**, 385 (1961).
- 7) Kitamura S., Hayakawa K., Sumino K., Senobe K., *Folia Pharmacol. Jpn.*, **63**, 228 (1967).

- 8) Kitamura S., *Adv. Neurol. Sci.*, **13**, 135 (1969).
- 9) Jensen S., Jernelov A., *Nature* (London), **223**, 753 (1969).
- 10) Winfrey M.R., Rudd J.W.M., *Environ. Contam. Toxicol.*, **9**, 853 (1990).
- 11) WHO, "Environmental Health Criteria 1: Mercury," World Health Organization, Geneva, 1976, p.144.
- 12) WHO, "Environmental Health Criteria 101: Methylmercury," World Health Organization, Geneva, 1991, p.168.
- 13) Clarkson T.W., "Critical Reviews in Toxicology," Vol.1, Issue 2, ed. by Goldberg L., Chemical Rubber Co., Cleveland, 1972, p.203.
- 14) Nordberg G., Skerfving S., "Mercury in the Environment," ed. by Friberg L., Vostal J., Chemical Rubber Co., Cleveland, 1972, p.29.
- 15) Clausing P., Riedel B., Gericke S., Grun G., Muller L., *Arch. Toxicol.*, **59**, 249 (1986).
- 16) Hirayama K., Yasutake A., Inoue M., *Biochem. Pharmacol.*, **36**, 1919 (1987).
- 17) Yasutake A., Hirayama K., *Arch. Toxicol.*, **59**, 99 (1986).
- 18) Kostyniak P.J., *Toxicol. Lett.*, **6**, 405 (1980).
- 19) Tanaka T., Naganuma A., Miura N., Imura N., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **112**, 58 (1992).
- 20) Tanaka-Kagawa T., Naganuma A., Imura N., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **264**, 776 (1993).
- 21) Mulder K.M., Kostyniak P.J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **78**, 451 (1985).
- 22) Dutczak W.J., Clarkson T.W., Ballatori N., *Am. J. Physiol.*, **260**, G873 (1991).
- 23) Naganuma A., Koyama Y., Imura N., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **54**, 405 (1980).
- 24) Miettinen J.K., "Mercury, Mercurials and Mercaptans," Vol.3, ed. by Miller M.W., Clarkson T.W., Charles C. Thomas, Springfield, 1973, p.233.
- 25) Aberg A., Ekman L., Rolf F., Greits U., Pesson G., Snihs J., *Arch. Environ. Health*, **19**, 478 (1969).
- 26) Miettinen J.K., Rahola T., Hattula T., Rissanen K., Tillander M., *Ann. Clin. Res.*, **3**, 118 (1971).
- 27) Smith J.C., Allen P.V., Turner M.D., Most B., Fisher H.L., Hall L.L., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **128**, 251 (1994).
- 28) Sasser L.B., Jarboe G.E., Walter B.K., Kelman B.J., *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **157**, 57 (1978).
- 29) Mehra M., Choi B.H., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **49**, 28 (1981).
- 30) Doi R., Kobayashi T., *Jpn. J. Exp. Med.*, **52**, 307 (1982).
- 31) Thomas D.J., Fisher H.L., Sumler M.R., Marcus A.H., Mushak P., Hall L.L., *Environ. Res.*, **41**, 219 (1986).
- 32) Thomas D.J., Fisher H.L., Sumler M.R., Hall L.L., Mushak P., *Environ. Res.*, **47**, 59 (1988).
- 33) Omata S., Kasama H., Hasegawa H., Ozaki K., Sugano H., *Arch. Toxicol.*, **59**, 249 (1986).
- 34) Ukita C., *KAGAKU*, **41**, 557 (1972).
- 35) Takeuchi T., Eto K., *Adv. Neurol. Sci.*, **18**, 845 (1974).
- 36) Berlin, M., Jerksell L.G., *Arch. Environ. Health*, **12**, 33 (1966).
- 37) Ishihara N., Suzuki T., *Tohoku J. Exp. Med.*, **120**, 361 (1976).
- 38) Yamamoto R., Naganuma A., Imura N., Suzuki T., Hisamichi S., *J. Toxicol. Sci.*, **8**, 328 (1983).

- 39) Suzuki T., Yonemoto J., Satoh H., Naganuma A., Imura N., Kigawa T., *J. Appl. Toxicol.*, **4**, 249 (1984).
- 40) Takeuchi T., Eto K., "Minamata Disease," ed. by Arima S., Seirinsha, Tokyo, 1979, p. 457.
- 41) Norseth T., Clarkson T.W., *Arch. Environ. Health*, **19**, 2775 (1970).
- 42) Magos L., Butler W.H., *Arch. Toxicol.*, **35**, 25 (1976).
- 43) Yamamoto R., Satoh H., Suzuki T., Naganuma A., Imura N., *Anal. Biochem.*, **101**, 254 (1980).
- 44) Komsta-Szumaska E., Czuba M., Reuhl K.R., Miller D.R., *Environ. Res.*, **32**, 247 (1983).
- 45) Spangler W.J., Spigarelli J.L., Rose J.M., Miller H.M., *Science*, **180**, 192 (1973).
- 46) Seko Y., Miura T., Takahashi M., Koyama T., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **49**, 259 (1981).
- 47) Norseth T., *Acta. Pharmacol. Toxicol.*, **30**, 172 (1971).
- 48) Takahashi H., Wada S., Suda I., Totoki S., Ohota J., *J. UOEH*, **10**, 117 (1988).
- 49) Suda I., Takahashi H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **82**, 45 (1986).
- 50) Suda I., Takahashi H., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **44**, 609 (1990).
- 51) Suda I., Totoki S., Takahashi H., *Arch. Toxicol.*, **65**, 129 (1991).
- 52) Suda I., Totoki S., Uchida T., Takahashi H., *Arch. Toxicol.*, **66**, 40 (1992).
- 53) Suda I., Takahashi H., *Arch. Toxicol.*, **66**, 34 (1992).
- 54) Tokuomi M., *Psychiat. Neurol. Jpn.*, **62**, 1816 (1960).
- 55) Tsubaki T., *NAIKA*, **21**, 871 (1968).
- 56) Uchino M., Futatsuka N., *Brain Medical*, **8**, 163 (1996).
- 57) Charbonneau S.M., Munro I.C., Nera E.A., Willes R.F., Kuiper-Goodman T., Iverson F., Moodie C.A., Stoltz D.R., Armstrong F.A.J., Uhe J.F., Grice H.C., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **27**, 569 (1974).
- 58) Ikeda Y., Tobe M., Kobayashi K., Suzuki S., Kawasaki Y., Yonemaru H., *Toxicology*, **1**, 361 (1973).
- 59) Sato T., Naganuma, A., "Advances in Mercury Toxicology," ed. by Suzuki T., Imura N., Clarkson T.W., Plenum Press, New York, 1991, p.355.
- 60) Merigan W.H., Maurissen J.P.J., Weiss B., Eskin T., Lapham L.W., *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, **5**, 649 (1983).
- 61) Klein R., Herman S.P., Brubaker P.E., Lucier G.W., Krigman M.R., *Arch. Pathol.*, **93**, 408 (1972).
- 62) Takeuchi T., Morikawa N., Matsumoto H., Shiraishi Y., *Acta Neuropathol.*, **2**, 40 (1962).
- 63) Hunter D., Russell D.S., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **17**, 235 (1954).
- 64) Takeuchi T., *Acta Pathol. Jpn.*, **1**, 73 (1982).
- 65) Takeuchi T., Eto K., Okabe M., Katsuragi S., Miyajima H., *J. Kumamoto Medical Society*, **51**, 216 (1977).
- 66) Takeuchi T., Eto K., "Recent Advances in Minamata Disease Studies," Tokyo, Kodansha, 1986, p.117.
- 67) Al-Saleem T., *Bull. World Health Organ*, **53**, 99 (1976).
- 68) Cinca I., Dumitrescu I., Onaca P., Serbanescu A., Nestorescu B., *J. Neurol Neurosurg Psychiatry*, **43**, 143 (1980).
- 69) Davis L.E., Kornfeld M., Mooney H.S., Fiedler K.J., Haaland K.Y., Orrison W.W., Cernichiari E., Clarkson T.W., *Ann. Neurol.*, **35**, 680 (1994).
- 70) Harada M., *Bull. Inst. Constit. Med., Kumamoto Univ. Suppl.*, **25**, 1 (1976).

- 71) Takeuchi T., Eto K., *Neurotoxicology*, **1**, 1 (1979).
- 72) Choi B.H., *Prog. Neurobiol.*, **32**, 447 (1989).
- 73) Rapaport S.I., "Blood-Brain Barrier in Physiology and Medicine," Raven Press, New York, 1976, p.87.
- 74) Miura K., Imura N., *CRC Cri. Rev. Toxicol.*, **18**, 161 (1987).
- 75) Lakowicz J.R., Anderson C.J., *Chem.-Biol. Interact.*, **30**, 309 (1980).
- 76) Hammond P.B., Beliles R.P., "Toxicology-the Basic Science of Poisons," ed. by Casarett L.J., Doull J., Macmillan, New York, 1980, p.409.
- 77) Halbach S., *Arch. Toxicol.*, **64**, 315 (1990).
- 78) Omata S., Sakimura K., Ishii T., Sugano H., *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 333 (1978).
- 79) Rabenstein D.L., Fairhurs, M.T., *J. Am. Chem. Soc.*, **97**, 2086 (1975).
- 80) Naganuma A., Imura N., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**, 613 (1979).
- 81) Thomas D.J., Smith C.J., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**, 104 (1982).
- 82) Hirayama K., *Toxicol Appl. Pharmacol.*, **55**, 318 (1980).
- 83) Hirayama K., *Biochem. Pharmacol.*, **34**, 2030 (1985).
- 84) Aschner M., Clarkson T.W., *Brain Res.*, **462**, 32 (1988).
- 85) Aschner M., Clarkson T.W., *Pharmacol. Toxicol.*, **64**, 293 (1989).
- 86) Kerper L.E., Ballatori N., Clarkson T.W., *Am. J. Physiol.*, **262**, R761 (1992).
- 87) Sager P.R., Syversen T.L.M., *Exp. Neurol.*, **85**, 371 (1984).
- 88) Sager P.R., Syversen T.L.M., "The Cytoskeleton: A Target for Toxic Agents," ed. by Clarkson T.W., Sager P.R., Syversen T.L.M., Plenum Press, New York, 1986, p.97.
- 89) Miura K., Clarkson T.W., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **118**, 39 (1993).
- 90) Miura K., Clarkson T.W., Ikeda K., Naganuma A., Imura N., *Environ. Health Perspect.*, **102**, 313 (1994).
- 91) Magos L., Clarkson T.W., Allen J., *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 2203 (1978).
- 92) Ballatori N., Clarkson T.W., *Am. J. Physiol.*, **244**, G435 (1983).
- 93) Ballatori N., Clarkson T.W., *Science*, **216**, 61 (1982).
- 94) Naganuma A., Imura N., *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 679 (1984).
- 95) Ballatori N., Clarkson T.W., *Am. J. Physiol.*, **248**, G238 (1985).
- 96) Ballatori N., Boyer J.L., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **85**, 407 (1986).
- 97) Stei A.F., Gregus Z., Klaassen C.D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **93**, 351 (1988).
- 98) Urano T., Naganuma A., Imura N., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **60**, 197 (1988).
- 99) Urano T., Naganuma A., Imura N., *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **62**, 339 (1988).
- 100) Dutczak W.J., Truong A.T., Ballatori N., *Toxicologist*, **13**, 191 (1993).
- 101) Miura K., Ikeda K., Naganuma A., Imura N., *In Vitro Toxicology*, **7**, 59 (1994).
- 102) Verity M.A., Sarafian T., "Advances in Mercury Toxicology," ed. by Suzuki T., Imura N., Clarkson T.W., Plenum Press, New York, 1991, p.209.
- 103) Yoshino Y., Mozai T., Nakao K., *J. Neurochem.*, **13**, 1223 (1966).
- 104) Cavanagh J.B., Chen F.C.K., *Acta Neuropathol.*, **19**, 216 (1971).
- 105) Farris F.F., Smith J.C., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **13**, 451 (1975).
- 106) Verity M.A., Brown W.J., Cheung M., Czer G., *J. Neurochem.*, **29**, 673 (1977).
- 107) Syversen T.L.M., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **3**, 225 (1977).
- 108) Omata S., Sakimura K., Tsubaki H., Sugano H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **44**, 367

- (1978).
- 109) Omata S., Horigome T., Momose Y., Kambayashi M., Mochizuki M., Sugano H., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **56**, 207 (1980).
 - 110) Brown W.J., Yoshida N., *Adv. Neurol. Sci.*, **9**, 34 (1965).
 - 111) Miyakawa T., Deshimaru M., *Acta Neuropathol.*, **14**, 126 (1969).
 - 112) Chang L.W., Hartmann H.A., *Exp. Neurol.*, **35**, 122 (1972).
 - 113) Cavanagh J.B., "Neurotoxicology," ed. by Roizin L., Shiraki H., Crevic N., Raven Press, New York, 1977, p.283.
 - 114) Cavanagh J.B., Chen F.C.K., *Acta Neuropathol.*, **19**, 208 (1971).
 - 115) Omata S., Momose Y., Ueki H., Sugano H., *Arch. Toxicol.*, **49**, 203 (1982).
 - 116) Brubaker P.E., Klein R., Herman S.P., Lucier G.W., Alexander L.T., Long M.E., *Exp. Mol. Pathol.*, **18**, 263 (1973).
 - 117) Joiner F.E., Hupp E.W., *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, **8**, 465 (1979).
 - 118) Richardson R., Murphy S.D., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **29**, 289 (1974).
 - 119) Syversen T.L.M., *Toxicol. Lett.*, **10**, 31 (1982).
 - 120) Sarafian T.A., Cheung M.K., Verity M.A., *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **10**, 85 (1984).
 - 121) Sjoqvist A., Hultin T., *Chem. Biol. Interact.*, **6**, 131 (1973).
 - 122) Tiryaki D., Ucer U., Bermek E., *Experientia*, **32**, 1270 (1976).
 - 123) Sauve G.J., Nicholls D.M., *Int. J. Biochem.*, **13**, 981 (1981).
 - 124) Sugano H., Omata S., Tsubaki H., "Studies on the Health Effects of Alkylmercury in Japan," ed. by Tsubaki, T., Environmental Agency, Tokyo, 1975, p.129.
 - 125) Cheung M.K., Verity M.A., *J. Neurochem.*, **44**, 1799 (1985).
 - 126) Hasegawa K., Omata S., Sugano H., *Arch. Toxicol.*, **62**, 470 (1988).
 - 127) Kasama H., Itoh K., Omata S., Sugano H., *Arch. Toxicol.*, **63**, 226 (1989).
 - 128) Miura K., Suzuki K., Imura N., *Environ. Res.*, **17**, 453 (1978).
 - 129) Miura K., Nakada S., Suzuki K., Imura N., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **3**, 352 (1979).
 - 130) Nakada S., Imura N., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **53**, 24 (1980).
 - 131) Nakada S., Nomoto A., Imura N., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **4**, 184 (1980).
 - 132) Miura K., Inokawa M., Imura N., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **73**, 218 (1984).
 - 133) Imura N., Miura K., Inokawa M., Nakada S., *Toxicology*, **17**, 241 (1980).
 - 134) Nakada S., Imura N., *Neurotoxicology*, **3**, 249 (1982).
 - 135) Umeda M., Saito K., Hirose K., Saito M., *Jpn. J. Exp. Med.*, **39**, 47 (1969).
 - 136) Ramel C., *Nippon Ishikai Zasshi*, **61**, 1072 (1969).
 - 137) Sakai K., *Kumamoto Med. J.*, **28**, 124 (1975).
 - 138) Gruenwedel D.W., Cruikshank M.K., *Biochem. Pharmacol.*, **28**, 651 (1979).
 - 139) Gruenwedel D.W., Glaser J.F., Cruikshank M.K., *Chem.-Biol. Interact.*, **36**, 259 (1981).
 - 140) Chao E.S.E., Gierthy J.F., Frenkel G.D., *Biochem. Pharmacol.*, **33**, 1941 (1984).
 - 141) Nakazawa N., Makino F., Okada S., *Biochem. Pharmacol.*, **24**, 489 (1975).
 - 142) Frenkel G.D., Cain R., Chao E.S.E., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **127**, 849 (1985).
 - 143) Kuriyama R., Sakai H., *J. Biochem. (Tokyo)*, **76**, 651 (1974).
 - 144) Miura K., Imura N., "Advances in Mercury Toxicology," ed. by Suzuki T., Imura N., Clarkson T.W., Plenum Press, New York and London, 1991, p.241.
 - 145) Vogel D.G., Rabinovitch P.S., Mottet N.K., *Cell Tissue Kinet.*, **19**, 227 (1986).
 - 146) Zucker R.M., Elstein K.H., Easterling R.E., Massaro E.J., *Am. J. Pathol.*, **137**, 1187 (1990).

- 147) Ponce R.A., Kavanagh T.J., Mottet N.K., Whittaker S.G., Faustman E.M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **127**, 83 (1994).
- 148) Sager P.R., Doherty R.A., Olmsted J.B., *Exp. Cell Res.*, **146**, 127 (1983).
- 149) Ben Ze'ev A., Farmer S.R., Penman S., *Cell*, **17**, 319 (1979).
- 150) Pittenger M.F., Cleveland D.W., *J. Cell Biol.*, **101**, 1941 (1985).
- 151) Miura K., Imura N., *Biol. Trace Elem. Res.*, **21**, 313 (1989).
- 152) Miura K., Kobayashi Y., Toyoda H., Imura N., *J. Toxicol. Sciences*, (in press).
- 153) Abe T., Haga T., Kurokawa M., *Brain Res.*, **86**, 504 (1975).
- 154) Kunitomo M., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **204**, 310 (1994).
- 155) Nagashima K., Fujii Y., Tsukamoto T., Nukuzuma S., Satoh M., Fujita M., Fujioka Y., Akagi H., *Acta Neuropathol.*, **91**, 72 (1996).
- 156) Nagashima K., *Toxicol. Pathol.*, **25**, 624 (1997).
- 157) Nakamura A., Fujiyama J., Yasutake A., Wakamiya J., Umehara F., Izumo S., Osame M., *Abstracts of 9th Annual Joint Workshop by Minamata Disease Research Group and National Institute for Minamata Disease* (1993).
- 158) Nakagawa I., Miura K., Imura N., *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **42**, 25 (1996).
- 159) Juang M.S., Yonemura K., *Nature* (London), **256**, 211 (1975).
- 160) Juang M.S., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **35**, 183 (1976).
- 161) Bondy S.C., Anderson C.L., Harrington M.E., Prasad K.N., *Environ. Res.*, **19**, 102 (1979).
- 162) Nakazato Y., Asano T., Ohta A., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **48**, 171 (1979).
- 163) Komulainen H., Tuomist J., *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **48**, 199 (1981).
- 164) Atchison W.D., Clark A.W., Narahashi T., "Cellular and Molecular Neurotoxicology," ed. by Narahashi T., Raven Press, New York, 1984, p.23.
- 165) Cooper G.P., Manalis R.S., *Neurotoxicology*, **4**, 69 (1983).
- 166) McKay S.J., Reynolds J.N., Racz W.J., *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **64**, 656 (1986).
- 167) Rebel G., Guerin P., Prasad K.N., *Lipids*, **18**, 664 (1983).
- 168) Ganser A.L., Kirschner D.A., *Neurotoxicology*, **61**, 63 (1985).
- 169) Tayarani I., Lefauconnier J., Bourre J., *Neurotoxicology*, **8**, 543 (1988).
- 170) Hargreaves R.J., Moorhouse S.R., Gangoli S.F., Pelling D., "The Blood-Brain Barrier in Health and Disease," ed. by Suckling A.J., Rumsbury M.G., Bradbury M.W.B., Chichester, Ellis Horwood, 1986, p.165.
- 171) Aschner M., *Pharmacol. Toxicol.*, **59**, 151 (1986).
- 172) Spuhler K., Prasad K.N., *Biochem. Pharmacol.*, **29**, 201 (1980).
- 173) Von Burg R., Landry T., *J. Pharm. Pharmacol.*, **28**, 548 (1976).
- 174) Shamoo A.E., MacLennan D.H., Eldefrawi M.E., *Chem.-Biol. Interact.*, **12**, 41 (1976).
- 175) Atchison W.D., Narahashi T., *Neurotoxicology*, **3**, 37 (1982).
- 176) Quandt F.N., Kato E., Narahashi T., *Neurotoxicology*, **3**, 205 (1982).
- 177) Atchison W.D., *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **237**, 672 (1986).
- 178) Levesque P., Atchison W., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **94**, 55 (1988).
- 179) Levesque P., Atchison W., *Pharmacol. Exp. Ther.*, **256**, 236 (1991).
- 180) LeBel C.P., Ali S.F., McKee M., Bondy S.C., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **104**, 17 (1990).
- 181) LeBel C.P., Bondy S.C., *Neurochem. Int.*, **17**, 435 (1990).
- 182) Sarafian T., Verity M.A., *Int. J. Devl. Neuroscience*, **9**, 147 (1991).
- 183) Usuki F., Ishiura S., *Clinic. Neurosci.* **9**, 2291 (1998).
- 184) Chang L.W., Gilbert M., Sprecher J., *Environ. Res.*, **17**, 356 (1978).

- 185) Ganther H.E., *Environ. Health Perspect.*, **25**, 71 (1978).
- 186) Welsh S.O., *J. Nutr.*, **109**, 1673 (1979).
- 187) Prasad K.N., Ramanujam S., *Environ. Res.*, **21**, 343 (1980).
- 188) Kasuya M., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **23**, 347 (1975).
- 189) Ganther H.E., *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **355**, 212 (1980).
- 190) Cox C., Clarkson T.W., Marsh D.O., Amin-Zaki L., Tikriti S., Myers G.G., *Environ. Res.*, **49**, 318 (1989).
- 191) Reuhl K.R., Chang L.W., *Neurotoxicology*, **1**, 21 (1979).
- 192) Choi B.H., Lapham L.W., Amin-Zaki L., Saleem T., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **37**, 719 (1978).
- 193) Choi B.H., Lapham L.W., *Fed. Proc.*, **39**, 396 (1980).
- 194) Matsumoto H., Koya G., Takeuchi T., *J. Neuropathol. Exp. Neurol.*, **24**, 563 (1965).
- 195) Sager P.R., Aschner M., Rodier P.M., *Develop. Brain Res.*, **132**, 1 (1984).
- 196) Rodier P.M., Aschner M., Sager P.R., *Neurobehav. Toxicol. Teratol.*, **6**, 379 (1984).
- 197) Ganther H.E., Goudie C., Sunde M.L., Kopecky M.J., Wagner P., Oh S.H., Hoekstra W. G., *Science*, **175**, 1122 (1972).
- 198) Chang L.W., Suber R., *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **29**, 285 (1982).
- 199) Satoh H., Yasuda N., Shimai S., *Toxicol. Lett.*, **25**, 199 (1985).
- 200) Nobunaga T., Satoh H., Suzuki T., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**, 79 (1979).
- 201) Nishikido N., Furuyashiki K., Naganuma A., Suzuki T., Imura N., *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **88**, 322 (1987).
- 202) Nishikido N., Satoh Y., Naganuma A., Imura N., *Toxicol. Lett.*, **40**, 153 (1988).
- 203) Morimoto K., Iijima S., Koizumi A., *Mutat. Res.*, **102**, 183 (1982).
- 204) Gilbert M.M., Sprecher J., Chang L.W., Meister L.F., *J. Toxicol. Environ. Health*, **12**, 767 (1983).
- 205) Ohi G., Nishigaki S., Seki H., Tamura Y., Maki T., Minowa K., Shimamura Y., Mizoguchi I., Inaba Y., Tazikawa Y., Kawanishi Y., *Food Cosmet. Toxicol.*, **18**, 139 (1980).