まぐろ中の水銀化合物の生体に及ぼす影響について

I まぐろ投与猫に於ける生体試料中水銀濃度と末梢血リンパ球異常染色体発現との Dose-Response Relationship

Health Effects of Long-term Tuna Diet in Cats

- I. On the dose-response relationship between the amount of tuna consumed and the numerical aberration of lymphocyte chromosome

久留米大学医学部公衆衛生学教室

白水美智子・賀来俊輔・下條信弘・佐野憲一

筑波大学医学専門群社会医学系

山口誠哉

Michiko Shiramizu, Shunsuke Kaku, Nobuhiro Shimojo and Kenichi Sano

Department of Public Health, Kurume University, School of Medicine

Seiya Yamaguchi

Department of Community Medicine, The University of Tsukuba

A positive correlation between the amount of mercury contaminated tuna intake and the amount of mercury in the human scalp hair has been observed in both the epidemiological and the experimental studies, and also the evidence showed the positive dose-response relationship between the amount of intake of methyl mercury incorporated in mercury contaminated fishes and the concentration of mercury in blood samples. However, other problem for health effects of long-term tuna diet has not been obvious.

In order to determine the health effects of long-term tuna diet, the cats fed with tuna meat in this experiment for more than two years have been observed for the accumulation of mercury in various organs and related health effects including the numerical aberration of lymphocyte chromosome.

The experimental cats were divided into two groups according to the mercury levels in the tuna. The first group were given tuna of mercury level 0.665 ppm, and the second group were given tuna of mercury level 0.995 ppm.

A comparison was made on the concentration of mercury in the biological specimens between control and experimental groups, and the mercury levels in the experimental groups were obviously higher than those in the control group. Also, the cats in the second group showed more frequent and significant symptoms than those of the first group.

The percentage frequencies of the numerical aberration of lymphocyte chromosome in the control group, the first group and the second group were 3.62, 29.3 and 62.5%, respectively. The difference in each group was statistically significant.

I. 緒 言

水銀、特にメチル水銀含有のまぐろの摂取が動物はもとより、ある種の職業の人々の毛髪中水銀、血液中水銀量を増加させる事実が諸家の研究の結果、明白となっ

た¹⁻³⁾。一方、セレンの共存がメチル水銀摂取の際、生体反応に種々の影響を及ぼすといわれている⁴⁻⁷⁾。

著者等は、メチル水銀に加えてセレンがかなりの濃度で含有されているまぐろを長期間猫に摂取させた結果、毛髪、血液、大脳、小脳、肝、腎等の生体試料中の水銀増

加とともに一部の猫においては後肢の麻痺, 小脳皮質の変性像等のメチル水銀中毒時の所見と極めて類似する所見の他に, 肝細胞のミトコンドリアの変化も認め^{2, 8, 9)}。他方, 水銀化合物が細胞分裂におよぼす影響は, 多くの研究者によって報告されているが, その中で Ramel C^{10, 11)} は有機水銀処理のタマネギの根端細胞で C-mitosis を認め, 更に *Drosophila melanogaster* の幼虫および成虫を, 水酸化メチル水銀, 水酸化フェニル水銀含有の餌で飼育した結果, いづれの場合も異常子の増加がみられたことを, 又 Umeda¹²⁾ は, 培地にフェニル水銀化合物, アルキル水銀化合物を添加した結果, Hela cell に於て polynuclear cell, abnormal mitotic cell の増加がみられたことを報告している。人間においても, Fiskejo G¹³⁾ は *in vitro* でメチル水銀化合物に暴露した人々の白血球で C-mitotic effect が認められたことを, Kerstin Hansson 等¹⁴⁾ はメチル水銀で汚染された魚を摂取した人々の血中水銀濃度の増加と培養リンパ球の chromosome break の頻度の増加を報告している。

著者等は水銀含有まぐろ (まぐろフレークおよびまぐろ生肉) の猫に対する長期投与の生体におよぼす影響として, 特にリンパ球染色体の影響と生体への水銀蓄積量を実験的に検討した。その結果, 対照群に比し, 実験群の動物の方が生体試料中の水銀濃度は高く, かつ染色体異常の発現頻度も高かった。

実験群の中でも, フレーク投与群の猫よりもフレークより高濃度水銀を含むまぐろ生肉を投与した猫に於て, 生体試料中水銀濃度が高いばかりではなく, 染色体発現頻度も高かった。

II. 実験方法

〔材料および方法〕

実験動物: 体重 1 kg 前後の猫 9 匹を, 実験群 I, II および対照群に各々 3 匹ずつ, 分類。

飼料:

実験群 I: 米飯, 牛肉又は鶏肉ミンチ, 飼育用ビタミンよりなる基本食にまぐろフレークを添加

実験群 II: 同上の基本食に本まぐろ生肉を添加 (但し No. 4, No. 5 の猫は最初の 6 カ月間のみカジキマグロの生肉を使用)

対照群: 動物飼育用飼料 (キャネット) にドッグミールを混合し, それにビタミンを添加

〔飼育期間〕

実験群 I: No. 1 の猫を 29 カ月間, No. 2 の猫を 7 カ月間, No. 3 の猫を 10 カ月間

上記飼料を 100 g/kg/day 投与し, それらを自由に摂取させ, 摂取量を毎日測定した。

実験群 II: No. 4, No. 5 の猫を 29 カ月間, No. 6 の猫を 22 カ月間

上記飼料を 100 g/kg/day 投与しそれらを自由に摂取させ, 摂取量を毎日測定した。

〔飼料, 生体試料中水銀濃度の測定〕

上記の飼育期間後, 採毛は実験動物の背側より, 採血はサフエナ静脈よりおこなった。一方, 総水銀の測定はデチゾン原子吸光法 (島津 UV-201) を, 塩化メチル水銀測定は ECD ガスクロマトグラフ法 (島津 GC-3AE) を用いた。メチル水銀測定値は, 塩化メチル水銀中の水銀量として表わした。

〔末梢血リンパ球の培養および標本作成〕

リンパ球培養, および染色体標本作成は山極等¹⁵⁾の方法を改良して用いた。ヘパリン処理の採血液 1 ml に, 生理食塩水 1 ml, Lymphprep 1.5 ml を加え, 800 rpm で 40 分間の遠心分離後リンパ層 0.2 ml を採取し, 37°C で 72 時間培養を行なった。又コルセミド処理は 4 時間とした。

〔飼育期間中の臨床症状の観察〕

実験動物の観察は a) 音に対する耳, 頭の動き, b)

表 1 飼料中の水銀濃度

飼料名	総水銀 (ppm)	塩化メチル水銀 (ppm)	塩化メチル水銀/総水銀 × 100 (%)
ねこ飼育用の固形飼料	N.D	N.D	—
米	0.011 ± 0.002	N.D	—
鶏肉, 牛肉の混合肉	0.003 ± 0.003	N.D	—
まぐろ フレーク	S. 47年 9月 ~ S. 48年 8月	0.862 ± 0.218	0.446 ± 0.067
	S. 48年 9月 ~ S. 50年 2月	0.483 ± 0.166	0.233 ± 0.096
	S. 50年 3月 ~ S. 50年 5月	0.760 ± 0.252	0.360 ± 0.092
かじきまぐろ生肉	0.113 ± 0.070	0.068 ± 0.044	60.0
本まぐろ生肉	0.995 ± 0.353	0.509 ± 0.118	51.0

反射に対する目の動き，c) 光に対する瞳孔の反応，d) 飛び上がり，飛び降り時の四肢，e) 歩行時の四肢に特に注目した。

Ⅲ. 結 果

実験に用いた飼料中の水銀含有量は表 1 に示している。まぐろフレークは購入時によりかなりの濃度差がみられたので，表に示す如く分類を行ない，それらの平均値は総水銀の場合 0.665 ± 0.260 ppm，メチル水銀の場合 0.330 ± 0.128 ppm であった。他方実験Ⅱ群の猫に与

えたカジキまぐろ，本まぐろ生肉中の濃度は，魚の体重，部位により異なったが，各々の総水銀濃度は， 0.113 ± 0.070 ppm， 0.995 ± 0.353 ppm であり，メチル水銀濃度はそれぞれ， 0.068 ± 0.044 ppm， 0.509 ± 0.118 ppm なる値を示した。すなわち総水銀，メチル水銀共に，まぐろフレークより本まぐろ生肉の方に高濃度に含まれていた ($p < 0.001$, $p < 0.001$)。しかし，メチル水銀量の総水銀量に対する比は，フレークでは 49.6%，本まぐろ生肉では 51.0% と二者間に差は認められなかった。

これらの飼料による各動物の月別における 1 日あたり

の水銀摂取量の詳細に関しては図 1 で表わしているが，実験Ⅱ群の方がⅠ群よりも，1 日の水銀摂取量は比較的多い。図で示されるように，1 日の水銀摂取量は，体重の増減と共に変動するのはもちろんであるが，他にフレーク，及びまぐろ生肉中水銀含有の変動に大きく左右される。実験期間中に於ける総水銀摂取量は，実験Ⅰ群 $72.1 \mu\text{g/day/匹}$ ，実験Ⅱ群 $107.1 \mu\text{g/day/匹}$ ，メチル水銀摂取量は実験Ⅰ群 $36.5 \mu\text{g/day/匹}$ ，Ⅱ群 $51.9 \mu\text{g/day/匹}$ であった。表 2 は，血液培養時に於ける水銀の総摂取量，及び血液，体毛，大脳，小脳，肝，腎中の水銀濃度との関係を示したものである。この表からも明らかであるように，

図 1 月毎における 1 日あたりの総水銀摂取量

表 2 実験中に摂取した水銀総量及び血液培養時の生体試料中の水銀濃度

(ppm)

		水銀摂取量 (mg)		血 液		毛 髪		大 脳		小 脳		肝 臓		腎 臓	
		Total Hg	MMC	Total Hg	MMC	Total Hg	MMC	Total Hg	MMC	Total Hg	MMC	Total Hg	MMC	Total Hg	MMC
対照群	No. 1	trace	trace	0.035	N.D	2.268	0.582	0.072	0.040	0.141	0.089	0.303	0.066	0.350	0.040
	No. 2	trace	trace	0.060	0.030	2.307	0.627	0.122	0.043	0.218	0.174	0.578	0.104	0.373	0.063
	No. 3	trace	trace	0.109	0.060	4.359	1.608	0.110	0.094	0.184	0.032	0.271	0.102	0.351	0.313
実験群	No. 1	59.11	25.44	2.267	1.070	55.33	44.27	5.813	3.860	4.931	3.760	34.30	7.040	5.406	1.781
	No. 2	21.52	10.38	0.680	0.419	10.62	8.740	0.738	0.300	0.998	0.580	10.23	0.710	1.048	0.410
	No. 3	25.75	12.42	1.095	0.544	23.25	16.76	—	—	—	—	—	—	—	—
	No. 4	93.65	55.64	4.160	2.505	105.0	104.6	5.768	3.560	5.462	2.360	65.34	7.000	7.079	2.700
	No. 5	95.30	56.61	4.226	1.861	121.1	119.6	—	—	—	—	—	—	—	—
	No. 6	88.33	52.64	6.540	4.595	111.9	96.11	5.762	2.730	5.896	2.896	82.60	6.820	10.01	4.510

摂取した水銀量の増加とともに血中及び体毛中での水銀蓄積が増加する事実, 又まぐろ摂取によって各器官組織

内に水銀が蓄積する事実は, 著者等の前回の実験報告と同様であった。

図2 染色体数異常 (×1000)

表 3 染色体数別によるリンパ球細胞の発現数

Case No.	性	観察した細胞数	染色体異常をもつ細胞の発現数	染 色 体 数																
				30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	45~50
対 照 群 No. 1	M	51	3 (5.9%)							2	1	48								
No. 2	F	40	1 (2.5%)								1	39								
No. 3	M	41	1 (2.1%)									46								1
実験 I 群 No. 1	F	46	15 (32.1%)	3		4			3	4		31								1
No. 2	F	42	17 (40.4%)	3		3	1		3	3		25		1	2					1
No. 3	M	43	12 (19.4%)						4	5	2	50								1
実験 II 群 No. 4	F	64	39 (60.9%)		1		1	7		6	8	25	5	5	1	3				2
No. 5	M	59	34 (57.6%)			3		3	1	11	5	25	3	4	2					2
No. 6	F	37	27 (73.0%)	2		8		1	4	2	4	10	2	1	2					1

図 3 染色体数別によるリンパ球細胞の発現率

一方培養リンパ球の染色体分析は HSU 等¹⁰⁾の分類に基づいておこない、検鏡はプレパラート一枚に存在する細胞を基準にしたので、表に示す如く個体により観察した細胞数は異なる。まぐろの摂取により、リンパ球染色体は、少数性異常体、高数性異常体を生じ、それらの

染色体数異常の発現頻度も血中水銀濃度の上昇と共に高くなる傾向があることは、表 3 で明らかである。染色体数異常発現率は、対照群 3.62%，実験 I 群 29.3%，実験 II 群 62.5% であり、対照群と実験群 (I, II 群)、実験 I 群と II 群間の比較の結果は、対照群より実験群が高く ($0.005 < p < 0.001$)、実験群に於ては I 群より II 群の方が高い値であった ($p < 0.001$)。血中水銀濃度の異なる実験 I 群と II 群での猫培養リンパ球染色体に於て、染色体数異常の発現率、および血中水銀濃度と染色体数発現の相関 pattern が異なった。すなわち図 3 でしめされるように、血中水銀濃度が低い場合、染色体の発現型は、染色体数 38 本をピークとした鋭い一峰型を示すけれども、血中水銀が高くなるに伴い、それは鈍い一峰型をなす。更に実験群のリンパ球染色体に関しては、染色体数異常だけではなく、染色体の形態異常も認められたが、主な構造異常は染色体切断によるものであった(図 4)。それらの染色体形態異常は、実験 II 群の No. 7, No. 8 の猫で多くみられたが、ここではその染色体構造異常と血中水銀濃度との関係の詳しい検索はおこなわなかった。

上述の結果からわかるように、まぐろを摂取した個体から得られた培養リンパ球の染色体には数的異常のほか、構造異常が生じたことは明らかであるが、異常染色

図4 染色体構造異常 (×1000)

体が発現するようなまぐろによる水銀摂取をおこなった場合、いかなる臨床症状を伴うものであるか表4に列挙した点に特に注目して観察をおこなった。対照群、実験Ⅰ群の猫では観察した点での異常は認められなかったが、実験Ⅱ群においては、歩行の際、後肢に異常が認められやや下半身が下がり、腰を左右にふるような姿勢をしめた。特に No. 6 の個体は、飼育開始後16カ月頃、その様子がかなりひどかったが、その後一次的に回復し、再び採血時に異常をきたしてきた。体重の増減に関しては、対照群では実験期間をとおして増加の傾向を示すのに対し、実験Ⅱ群では飼育開始後21カ月頃から減少の傾向をしめた。実験Ⅰ群のうち No. 1 のみは、実験開始後1

年目ごろから、体重減増がみられなかった。

Ⅳ. 考 察

魚類の中でもきわめて水銀含有が高いといわれるまぐろ摂取による生体への影響は、今日まで多くの研究者等^{1-3,8,9)}によって論議されてきた。山中等¹⁾は、まぐろ漁船員の毛髪中水銀が一般人よりも極めて高い値を示すことを、又山口等^{2,3,8,9)}はまぐろを猫に長期間投与した場合、体毛中水銀はもとより各臓器中水銀量は上昇し、あるものは後肢に異常をきたし、小脳のプルキンエ細胞の脱落、肝細胞のミトコンドリアの異常等を報告している。しかしながら1日の摂取量、および総摂取量と生体

表4 血液培養時の臨床症状

Case No.	音に対する耳、頭への動き	反射に対する目の動き	光に対する瞳孔の反応	飛び上がり時の四肢	歩行時の四肢
対照群	No. 1	—	—	—	—
	No. 2	—	—	—	—
	No. 3	—	—	—	—
実験群	No. 1	—	—	—	±
	No. 2	—	—	—	—
	No. 3	—	—	—	—
	No. 4	—	—	—	+
	No. 5	—	—	—	++
	No. 6	—	—	—	++

* — 異常が認められない場合
 ± やや異常が認められる場合
 + 異常が認められる場合

への影響との関連はいまだ解明されていない。

今回著者等は猫にまぐろフレーク（総水銀濃度 0.665 ppm, メチル水銀濃度 0.330 ppm）を水銀量として 72.1 $\mu\text{g}/\text{day}$ /匹摂取させた場合、投与後 29 カ月でも臨床症状に異常は認められなかったが、フレークよりも高濃度の水銀を含むまぐろ生肉（総水銀濃度 0.995 ppm, メチル水銀濃度 0.509 ppm）を 107.1 $\mu\text{g}/\text{day}$ /匹投与した個体では投与後 21 カ月頃から体重が減少し、後肢に異常をきたし、わずかに腰をふる歩行をしめた。入鹿山等¹⁷⁾の報告によればネコに於て塩化メチル水銀 0.8~1.6 mg/kg/day, 総量 8~56 mg/kg 投与で神経症状が現われ、大脳、小脳にも病理所見がみられる。彼等の報告に比べ、今回投与したメチル水銀量は多いにもかかわらず顕著な神経症状が認められなかったのは、個体差というよりも、一日の摂取量が微量であるためであろう。

今回の実験結果から一日の摂取量と総摂取量および臨床症状の発現時期の三者の因果関係をみい出すことはできなかった。しかしながらなら臨床症状をしめさなかった猫で染色体数異常を生じたことは重要である。臨床症状を生じなかった I 群での異数体をもつ細胞の出現率は 29.3% であり、それらの染色体異常も少数性異数体が大部分であり、高数性異数体をもつ細胞は No. 2 にわずかに認められただけであった。しかし臨床症状を現わした II 群では、異数体をもつ細胞の発現率は 62.5% であり、実験 I 群より有意に高く ($0.05 < p < 0.001$) 又高数性異数体をもつ細胞の出現も多くみられた。わずかであるが、対照群での異常染色体の発現は、先の研究者等¹⁸⁻²⁰⁾によって報告されている範囲内の値であるが、それは培養又は標本作成の過程で生じたものであるかど

うかは不明である。Ramel, C (1969 年)¹⁰⁾ は、メチル水銀ジアミド、水酸化メチル水銀、メチル水銀ジシアニジアミド、水酸化フェニル水銀、塩化メチル水銀でタマネギの根端細胞を 4~72 時間処理した場合、使用したすべての水銀化合物によって C-mitosis を生じ、その結果倍数体と異数体の細胞がみられ、又有効最低濃度は、メチル水銀塩、フェニル水銀塩で 24 時間処理で 50 ng Hg/g であることを報告している。又 Umeda 等¹²⁾ は培地に種々の水銀化合物を溶解した時の Hela cell への影響を調べ、塩化第二水銀は 3.2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で、塩化フェニル水銀、塩化エチル水銀、および塩化ブチル水銀は、0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で細胞の成長を阻害し、分裂期の細胞に chromosome の凝縮、短縮がみられ、更にその 10 倍の濃度で細胞破壊が生じたことを観察している。彼等の報告でも、有機水銀化合物は無機水銀化合物よりも、分裂期細胞に強い影響を与え、特にメチル水銀化合物は比較的低濃度で染色体異常を起こすことは明らかである。著者等の実験群の個体のリンパ球染色体でみられた染色体構造異常については、Kestin Hansson 等¹⁴⁾ や Yukimasa Shiraishi 等¹⁸⁾ が報告している chromosome break と同じようなものであり、それらの典型は acentric chromosome, chromatid break, dicentric chromosome 等の異常である。染色体構造異常の発現と血液水銀濃度に関して、今回詳細なことは検討しなかったが、Kestin Hansson 等¹⁴⁾ は (1970 年)、汚染された魚を多食した人のリンパ球を培養し、血中水銀濃度と chromosome break をもつ細胞の出現頻度とに相関があることを報告しており、又著者等の実験に於ても、染色体構造異常をもつ細胞が、実験 I 群よりも実験 II 群のネコで多く観察された。このようにまぐろ摂取により生じた chromosome break が、復旧された染色体をつくるのか、又は復旧されず断片として残るのか、あるいは交換型異常の形で残るのかどうかは、染色体構造異常の詳しい分析をおこなっていないので不明である。それ故に染色体異常が、遺伝的にどのような影響を及ぼすのかという問題に関しては、本実験結果からは明らかにできない。

文 献

- 1) 山中すみえ：マグロおよびマグロ漁船員の毛髪中水銀量，日衛誌，**27**，117 (1972)。
- 2) 山口誠哉：まぐろ中水銀化合物の生体に及ぼす影響について，日衛誌，**28**，60 (1973)。
- 3) 山口誠哉：昭和 50 年度環境庁委託研究報告書，日本公衆衛生協会。

- 4) H. E. Ganther: Selenium, Relation to decreased toxicity of methyl mercury added to diets containing Tuna, *Science*, **175**, 1122-1124 (1972).
- 5) C. A. Bache and D. J. Lisk: Dietary selenium protection of methyl mercury intoxication of Japanese quail, *Environ. Contamination and Toxicology*, **11**, 152-157 (1974).
- 6) 上田喜一: セレニウム, メチル水銀中毒に対する効果, 文部省特定研究「難病」班, 303-307, 昭和49年度業績集.
- 7) G. Ohi, et al.: Interaction of dietary methyl mercury and selenium on accumulation and retention of these substances in rat organs, *Toxicology and Pharmacology*, **32**, 527-533 (1975).
- 8) L. W. Chang and S. Yamaguchi: Changes in cats following long-term diet of mercury contaminated Tuna, *Acta. Neuropath.*, **27**, 171-176 (1974).
- 9) L. W. Chang and S. Yamaguchi: Ultrastructural changes in the liver after long-term diet of mercury contaminated Tuna, *Environ. Research*, **7**, 133-148, 1974.
- 10) C. Ramel: Genetic effects of organic mercury compounds, I. cytological investigation on allium root, *Hereditas*, **61**, 208-230 (1969).
- 11) C. Ramel: Genetic effects of organic mercury compounds, II. chromosome segregation in *Drosophila melanogaster*, *Hereditas*, **64**, 142-146 (1970).
- 12) M. Umeda, K. Saito, K. Hirose and M. Saito: Cytotoxic effect of inorganic, phenyl and alkyl mercuric compounds on Hela Cells, *Jap. J. Exp. Med.*, **39**, 47-58 (1969).
- 13) G. Fiskesjo: The effect of two organic mercury compounds on human leucocytes in vitro, *Hereditas*, **64**, 142-146 (1970).
- 14) K. Hansson and J. Lidsten: Chromosome breakage in human exposed to methyl mercury through fish consumption, *Arch. Environ. Health*, **21**, 133-139 (1970).
- 15) 山極 隆: やさしい組織培養の方法, 実験観察のページ, **4**, 99-105.
- 16) T. C. Hsu and H. H. Rearden: Further karyological studies on Felidae, *Chromosoma*, **16**, 365-371 (1965).
- 17) 入鹿山且郎: 水俣病, 393-399, 熊本大学医学部水俣病研究班, 昭和41年.
- 18) Y. Shiraishi and T. Yoshida: Chromosomal abnormalities in cultured leucocyte cells from Itai-Itai disease patients, *Proc. Japan. Acad.*, **48**, 248-251 (1972).
- 19) H. A. Lubs and J. Samelson: Chromosome abnormalities in lymphocytes cells from normal human subjects, *Cytogenetics*, **6**, 402-411, (1967).
- 20) E. Nichols, A. Levan and M. Peluuse: Synergism of the Schmidt-Ruppinstrain of the Rous sarcoma virus and cytidine triphosphate in the induction of chromosome breaks in human cultured leucocytes, *Hereditas*, **54**, 1-27, (1966).

(受付 1976年1月23日)