Dimercaptosuccinic Acid (Meso 型) の重金属排泄効果に 関する実験的研究 ——とくに鉛, 水銀について——

白石陽治*

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE EXCRETION OF HEAVY METALS BY ADMINISTRATION OF DIMERCAPTOSUCCINIC ACID (MESO TYPE) ——WITH SPECIAL REFERENCE TO LEAD AND MERCURY——

Yohji SHIRAISHI

So far possibility of preventive medical application of dimercaptosuccinic acid (D.M.S.) has been studied so little that we have almost a virgin land, where detoxication of heavy metals, prevention of radiation injuries, and other pharmaceutical and pharmacological investigations have to be cultivated. Having surveyed results concerning D.M.S. hitherto reported, the present author considered that it would be significant to apply the acid to the detoxication of lead and mercurial poisonings, and performed a series of experiments to see its effectiveness.

Experiments in acute poisoning, LD 50 and its observation, were made on mice.

Changes in the body weight, blood findings, urinary findings, and the quantity of lead and mercury excreted into the urine of lead- and mercury-administered rabbits, were seen under administration of D.M.S. And the effectiveness of D.M.S. was judged by comparing its results with those obtained by the use of BAL and Ca-EDTA, and with the results of the control group. The results are as follows.

1. LD₅₀ of D.M.S. on mice was found to be 3,132 mg/kg (± 44 mg/kg) by probit method.

2. Mice were subjected to acute poisoning and put under observation. Abnormality was not found up to the dosis 2.8 g/kg, a slight though temporary change was seen at 2.9 g/kg, and at 3.0 g/kg it became remarkable. Just before their death came dyspnea and deep breathing in turns, tail-raising, pupillary dilation, and short fits of convulsions.

Those convulsions were of tetanic-clonic type, and their recurrence was fatally serious with short intervals every time. Other symptoms immediately before death were generally inhibitory—pilo-erection, swaying of the body, cyanosis, lying on the side, and repeated fits of tetanic-clonic convulsions occurring at special locations of the lower parts of the leg and at muscles of mastication.

3. Decreasing in body weight of rabbits was the smallest in the D.M.S.-administered group, especially in the lead poisoning.

4. Blood findings. In the D.M.S.-administered group an early recovery of anemia was seen and erythrocytes with basophilic stipplings were likely to appear in far less degree and disappeared more quickly.

5. Urinary findings. In the D.M.S.-administered group diminution of the urine amount was prevented, and this effect was seen markedly in mercurial poisoning. Disturbance of renal functions due to lead-poisoning was slightly less in degree in the BAL-administered group and in the Ca-EDTA-administered group. The renal disturbance due to mercurial poisoning was least in the D.M.S.-administered group.

6. The excretion-promoting effect of D.M.S. for heavy metals progressed day after day, the excreted concentration of the metals becoming higher and higher as days went on, and the excretion was completed comparatively early. But D.M.S. was somewhat different from Ca-EDTA and BAL which caused excretion in large quantity immediately after administration. The total quantity of the excreted lead during the experimental period was larger in the D.M.S.-administered group than in the Ca-EDTA-

*日本大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 西川眞八教授)
昭和43年3月5日受付, 特別掲載

†From the Department of Public Health, Nihon University School of Medicine.

Received for publication on Mar. 5, 1968.

administered group but less in the BAL-administered group. That of mercury was the largest in the

結 論

重金属中毒の予防乃至治療については、有機チオール類であるルイサイトの解毒剤として有名な BAL (Dimercaptopropanol) に関しては多くの報告や文献があり、キレート剤である Ca-EDTA の出現以来、Penicillamine, Unbradil, ATA, 2-Mercaptoethylamine などさまざまな有機チオール類やキレート類である抱合解毒剤が試みられてきた^{1~4)}。

一般に生体内で生成した重金属—EDTA キレートは、安定度定数が高いため血清によく溶けて尿中に運び去られる。すなわち、Ca-EDTA の重金属解毒機転は、重金属キレート生成によって体内に侵入した重金属を排出する能力にのみ依存していると考えられる。しかしまた同時に Ca-EDTA の欠点としては、生体内の鉄・銅などが他の重金属と同時に排泄され、生体内必須微量金属の欠乏を招来するとか、Ca の欠乏をきたすとか、コレステロール代謝の変化と同時に腎障害を惹き起す副作用を持つなどの点で問題を残している⁵⁾。

1949年、Owen & Sultanbawa 一派により Dimercaptosuccinic Acid (以後 D. M. S. と略す) 製剤がつくられ、1952年にそのカリウム塩が合成され、1961年に至って漸く D. M. S. の構造が Gerecke 一派により決定された^{6~10)}。この化合物は、放射線障害の防禦作用を持ち^{11,12)}、BAL や Cysteamine を始めとする各種 SH 化合物群の中でもその効果は注目を浴びている。その防禦作用機構はいまだ十分には解明されていないが、自己の持つ SH 基によって生体内 SH 基をマスクし、あるいはそれと拮抗することによって生体の放射線感受性を修飾し、防禦作用を発揮するともいわれる^{11,12)}。

Meso 型 D.M.S. の毒性と重金属中毒に対する効果については、Cannavà 一派や Wang Shih-chau らにより考察されているにすぎず、わが国においてはいまだ検討されていない現状である。

著者は、Meso 型 D.M.S. の毒性について、マウスによる LD₅₀ をおこなうとともに、被検動物の D.M.S. 投与に対する反応を時間を追って観察し、かつ実験的に重金属中毒を起させた家兎に対して D.M.S. を投与して、その重金属中毒症状の改善と副作用についての検討を試みたので報告する。

D.M.S.-administered group.

Fig. 1. Chemical Structure of D.M.S.

実験材料および研究方法

実験材料：Meso 型 D.M.S. (東京薬科大学薬品化学・飯田英夫教授合成、森下製薬株式会社・柴崎健三博士提供) の融点は 192°C~194°C (Racemi 体は 126°C) であった。

実験はまず、毒性を調べるため LD₅₀ をみ、その後重金属の侵入に対する生体側の反応として、体重、血液ならびに尿検査をおこない、あわせて重金属の尿中排泄効果は、Ca-EDTA, BAL とも比較することにした。

実験 1. マウスによる Meso 型 D.M.S. の LD₅₀

1. 使用動物：動物は純系の ICR-JCL 系雄マウスで、体重 45.0~50.0 g をもち、飼料は実験中も実験前と同様合成飼料を与えた。

2. 薬物の投与方法：マウスを12群にわけ、投与量は 2,850 mg/kg から 3,400 mg/kg までの範囲で 50 mg/kg づつの差を持たせ、各群の動物数はそれぞれ10~35匹とした。動物は、標本のかたよりをなくするため、無作為に任意抽出法によって選び各群の動物数とした。

3. 薬物の調整：Meso 型 D.M.S. はそのままでは注射用蒸留水に溶けないので、10%炭酸ナトリウム溶液を加えて、Meso 型 Na-D.M.S. (Dimercaptosuccinic Acid Disodium Salt) とした後溶解し、D.M.S. を 3,000 mg/kg 投与した群に対し体重 10 g 当たり 1 ml となるように 3 g/dl の溶液をつくり、他群には同濃度の溶液をもちいて容量の増減により所要の投与量を得ることとした。

4. 投与方法：マウス背部に皮下注射した。

実験 2. 中毒症状の肉眼的所見

使用動物、薬物調整、投与方法などすべて LD₅₀ の実験と同様にし、各群より 3 匹づつ48時間にわたり経過を観察した。

実験 3. Meso 型 D.M.S. の鉛および水銀の尿中排泄に及ぼす影響

I. 鉛の排泄促進作用

1. 使用動物：在来白色種の雄性家兎で、体重 1.9～2.5kg のものを使用、飼料には、1日にキャベツ 100～130g、ニンジン 80～100g を給し、個体間に食餌量の不均衡が生じないように注意した。5羽を1群とし、対照群と BAL, Ca-EDTA および D.M.S. を各々投与して4群とした。

2. 薬物の調整：硝酸鉛（和光純薬試薬特級）15.984g を 1% 稀硝酸に溶かして全量を 1l とした。この 1ml 中には鉛として 10mg を含有する。BAL は 10% (W/V%) バル第1注射液（第1製薬）、Ca-EDTA は 25% の水分を有する結晶エチレン・ジ・アミン四酢酸・ジソーダー・モノ・カルシウム（第1化学薬品）を 2% 溶液としてもちいた。D.M.S. は、実験1.と同様にして、溜水 5ml に D.M.S. 100mg が溶解するようにし、対照としては溜水 5ml に食塩 100mg の割合に溶かした。

3. 投与方法および投与量：対照群（A群）、BAL 投与群（B群）、Ca-EDTA 投与群（C群）およびD.M.S. 投与群（D群）とした。まず硝酸鉛溶液を鉛として家兎の体重 1kg 当り 50mg の割合で背部に皮下注射で投与して急性中毒をおこさしめた。この注射後3時間して、A群には食塩 50mg/kg、B群以下各々 50mg/kg づつ各薬物を投与した。投与方法は、背部の皮下に注射した。

4. 検査項目・観察期間は8日間である。

④中毒状態の総合的指標として、体重を毎日測定した。

⑤鉛中毒の特異的な症状を検査するために血液については、赤血球数、好塩基点赤血球数および血色素量を測定した。好塩基点赤血球数は、普通塗沫ギームザ染色標本について、赤血球数 1,000 個当りの数をかぞえた。また血色素量はザーリー法をもちいた。

⑥尿については、1日の尿量の測定のほか尿中コプロポルフィリンの定性試験を Fischer-Brugsch 法で、尿蛋白、尿糖、潜血反応および pH は、4項目同時検出測定試験紙 Hema Combistix (Ames Company Internat. U.S.A.) をもちいておこない、ウロビリノーゲンは Ehrlich 氏法によった。

⑦尿に排泄される鉛の定量は、ジチゾンによる比色測定法（混色法）^{13,14)}によった。

II. 水銀の排泄促進作用

1. 使用動物：I.1.項に準じた。

2. 薬物の調整：投与水銀は、水銀 10.0g を正確に秤量し、1% の稀硝酸で溶解して全量を 1l とすると、1ml 中には水銀として 10mg 含まれる硝酸水銀溶液と

なる。BAL, Ca-EDTA, D.M.S. および対照は、I.2.項に準じた。

3. 投与方法および投与量：硝酸水銀溶液を水銀として家兎の体重 1kg 当り 50mg の割合で背部に皮下注射で投与して急性中毒をおこさしめた。他は I.3.項に準じた。

4. 検査項目：観察期間は10日間である。

I.4. ④, ⑤, ⑦の各項に準じた。

⑧尿に排泄される水銀の定量は、ジチゾンによる比色定量法のうち、比較的操作の簡単な Natelson¹⁵⁾ の方法に上田、西村、藤村¹⁶⁾らによって検討と改良を加えた単色法によった。

研究結果

実験 1. マウスによる Meso 型 D.M.S. の LD₅₀

この実験では比較的急性の中毒状態を見たいと考えたので、判定は注射後24時間とした。

LD₅₀ の計算は probit 法¹⁷⁾によったが、その結果 3,132 mg/kg (3,088～3,176 mg/kg) となった。

実験 2. 中毒症状の肉眼的所見

急性中毒をおこさせたマウスの逐時観察実験の結果から、各マウスは 2.8g/kg 投与までは外観的にも開腹所見でも多量投与において見られるような異常にはなかった。2.9g/kg になると注射20分後にやや元気がなくなるが、30分後には投与前の状態に戻る。3.0g/kg になるとそれがやや強くなり、注射直後閉眼してうずくまり、4時間38分後には腹部が濡れていた。散瞳・挙尾はなく、立毛はきわめて軽度であり、24時間後には体重もやや減少するが、歩行は可能で48時間後には投与前の状態になっていた。22時間42分後に死亡したマウスは、肝臓に軽度の充血像をみる他著変はなかった。

症状が重篤になると必ず、深呼吸と交互にくる呼吸困難の発作、挙尾、瞳孔散大および短い痙攣発作がおこり死亡する。また、この痙攣は、強直性一問代性型のものであって、それを反覆するものは重篤であり、その間隔が短いものほど死亡していた。さらに詳細に観察すると立毛、チアノーゼ、身体の動揺、不安定な走行、下肢や咬筋などの特定筋肉に間隔の比較的長い強直性一問代性の痙攣発作が反覆をして、横臥してしまうなどの諸症候が観察された。死の直前になると、症状は一般に抑制的である。すなわち、呼吸は稀となり横臥し眼をつむってしまう。もしも刺激を与えると限局された筋肉の攣縮がみられる。毛はしばしば湿潤となる。瀕死期には、糞と尿の失禁がある。そして死は一般に22時間から24時間後にくる。No. 1～No. 21 のマウスの示した症状ならびに

Tab. 1. Course of Changes

Dosage mg/kg	Mouse Number	Sex	Body-Weight before Injection g	Body-Weight after 24 Hours g	Body-Weight after 48 Hours or at Death g
3,400	1	♂	45.3	—	46.8
	2	♂	45.8	—	46.9
	3	♂	46.2	—	47.1
3,300	4	♂	45.8	—	46.6
	5	♂	46.3	—	47.5
	6	♂	47.1	45.6	45.2
3,200	7	♂	47.6	—	48.3
	8	♂	48.3	—	46.5
	9	♂	48.5	47.1	46.1
3,100	10	♂	48.4	44.8	43.9
	11	♂	47.9	45.2	44.1
	12	♂	46.8	—	45.1
3,000	13	♂	49.6	48.1	47.6
	14	♂	48.9	47.8	46.9
	15	♂	48.6	—	47.2
2,900	16	♂	46.8	46.2	46.0
	17	♂	45.9	45.1	45.0
	18	♂	46.2	45.7	45.7
2,800	19	♂	46.4	46.0	46.1
	20	♂	47.2	46.7	46.7
	21	♂	47.0	46.6	46.7

Tab. 2. Symptoms of Mice

Symptoms	3,400 mg/kg			3,300 mg/kg		
	1	2	3	4	5	6
poorly active	immediately after injection			immediately after injection		
piloerecting	25	7	18	33	4	3
unstable running	13	10	12	11	19	21
swaying of the body	—	—	18	31	47	17
both hind-legs paralysed	18	105	15	33	42	17
wet abdomen with urine	—	—	137	—	—	—
convulsing	133	150	—	144	—	—
tail-raising	25	32	45	74	47	50
pupillary dilation	25	23	43	46	53	43
crouching and shutting the eyes	123	98	18	74	83	43
lying on the side	85	105	108	144	93	141
death	139	157	141	171	163	survived
stretching hind-legs at death	+	+	+	+	+	/
cyanosis	13	10	18	12	18	22

N.B. The figures in this table show the time in minutes.

in the D.M.S.-administered Mice

Time to Death min.	The State after 24 Hours	The State after 48 Hours
139	—	—
157	—	—
141	—	—
171	—	—
163	—	—
—	quite weak	slightly weak
211	—	—
1,327	—	—
—	quite weak and crouching	slightly weaker than before injection
—	quite weak	quite active
—	quite weak	quite active
1,362	—	—
—	slightly weak	quite active
—	slightly weak	quite active
1,426	—	—
—	active	active
—	active	active
—	active	active
—	active	active
—	active	active
—	active	active
—	active	active

Injected Fatal Dose of D.M.S.

3,200 mg/kg			3,100 mg/kg			3,100 mg/kg		
7	8	9	10	11	12	13	14	15
immediately after injection			immediately after injection			immediately after injection		
19	38	13	—	—	10	3	5	6
19	—	—	—	—	—	—	—	—
92	—	—	—	—	—	—	—	—
19	24	44	—	—	10	—	—	720
—	—	—	301	300	—	278	270	—
203	1,323	—	—	—	1,320	—	—	1,400
52	—	—	—	—	—	—	—	—
61	—	—	—	—	—	—	—	—
26	24	44	—	—	—	—	—	—
178	—	—	—	—	1,320	—	—	998
211	1,327	survived	svrvived	survived	1,362	survived	survived	1,426
+	+	/	/	/	+	/	/	+
178	—	—	—	—	—	—	—	—

when the symptoms appeared after the injection.

経過を Tab. 1, 2 に掲げた。

実験 3. Meso 型 D.M.S. の鉛および水銀の尿中排泄に およぼす影響

I. 鉛の排泄促進作用

A. 体重の変化：(Fig. 2)

Fig. 2. Body-Weight (rise and fall rates of each group)

投与前はA群の平均値は2,234.0 gで各群間に有意な差はなく、硝酸鉛の投与により各群の体重増加はとまり、ことにA群は大きな体重減少傾向にあり、D群は体重減少が小さく、第6日目に最低値を示し、徐々に増加し、B群は第6日目より、C群は第5日より各々増加の兆をみるが、A群はその兆をみなかった。

この傾向は増減率よりみても全く同様のことがいえた。

各実験日について一元配置型の分散分析をおこなった結果では、第1, 4, 8日目においては各群の体重の減少には有意の差(p. 0.01)が認められた。第1日目ではD, C群の減少には有意な差はみられぬが、両群の減少は他群に比し明らかに小さい(p. 0.01)。第4日目ではD群の減少は有意に小さい(p. 0.01)。ついでC群で(p.

0.01), AB群間では差がなかった。第8日目ではD, C群が他群に比し体重の減少は小さく(p. 0.01), B群もA群に比して体重減少は僅かであった(p. 0.01)。

B. 血液所見：

①赤血球数；(Fig. 3) 投与前はA群の平均値は615.0

Fig. 3. Counts of Red Blood Corpuscles
(rise and fall rates of each group)

$\times 10^4$ で各群間に有意な差はなく、硝酸鉛の投与により24時間後には赤血球数は激減し、A群は第4日目に最低値を示し、以後第5日目より徐々に回復の傾向にあり、D群も第5日目頃より回復をみせ、第7日目より著しく増加し、B, C群は第2日目より徐々に回復をみた。

このことは増減率よりみても同様のことが言えた。

分散分析の結果では、第1, 4, 8日目においては各群の赤血球数の減少には有意の差がみられ(p. 0.01), 第1日目ではD群が最も小さい減少を示し(p. 0.01), 他群の間では有意な差は認めなかった。第4日目ではC, B群の間に差はみられぬが、A群に比し各群とも明らかに減少は小さく(p. 0.01), 第8日目ではD, C群間には有意の差はないが、D群はA, B群に比し明らかに小さい赤血球数の減少であった(p. 0.01)。

②血色素量；(Fig. 4) 投与前はA群の平均値は82.6%で各群間に有意な差はなく、硝酸鉛の投与により24時

Fig. 4. Hemoglobin (rise and fall rates of each group)
24時間後には血色素量は激減し、A群は第2日目最低値を示し、以後第3日目より徐々に回復の傾向にあり、D群は第1日目および第2日目には激減し、以後第4日目までは徐々に減少し、第5日目より回復の兆をみせ、以後著しい回復を示した。B、C群は第1日目には激減を示すが、以後は徐々に回復の傾向にある。

このことは、増減率よりみてもほぼ同様のことがいえた。

分散分析の結果では、第1、4、8日目においては各群の血色素量の減少には有意の差がみられ ($p < 0.01$)、第1日目ではD群の減少は最も小さく ($p < 0.01$)、ついでC、A群間には有意の差はないが、B群が最も大きい減少をみ、A群との間にも有意の差を認めた ($p < 0.01$)。第4日目ではC、B、D群間には有意の差はないが、A群よりは明らかに小さい減少をみた ($p < 0.01$)。第8日目ではD群は他群より明らかに小さい血色素量の減少であった。

③好塩基点赤血球数；投与前は各群ともその出現をみず、硝酸鉛の投与にてもその出現は非常に少なく、A群においては第3日目に最も著しい出現をみ、以後漸減の傾向にあるが、実験期間中その消失をみなかった。他群

においてはほぼ同様の傾向をとり、C群は第4日目より、B群は第5日目より、そしてD群は第6日目より各々その出現をみなくなった。

C. 尿所見：

①尿量；投与前はA群の平均値は 228.4 ml/day で、硝酸鉛の投与によりA群では尿量は第6日目まで徐々に増加し、第7日目には一旦減少するが、第8日目にはまた増加している。D群は第2日目と第5日目および第7日目には高い排泄量を示し、全経過中増減が著しいが、8日間の総排泄量は最も多い。C群は概して変動が少なく、8日間の総量よりみてもA群について少なかった。B群は第1日目には著しく減少するが、第2日目以後は比較的変動の少ない尿量であった。

増減率よりみても同様のことがいえた。

分散分析すると、第1、8日目においては各群の尿量の増減には有意の差がみられ ($p < 0.01$)、第1日目ではB群の減少が他群に比し著しく大きく ($p < 0.01$)、第8日目ではC、D、B群間には有意の差はないが、A群が他群に比し大きい増加を示した ($p < 0.05$)。

②尿のpH；投与前のA群の平均 pH は 8.4 で、硝酸鉛の投与前においても、投与後においても各群間に有意の差はみられなかった。各群とも投与前は pH8~9 の間にあり、A群は第1日目よりやや低下する傾向にあるが、第3日目より徐々に旧に復した。他群はほぼ安定しており、ことにD群は硝酸鉛投与後の pH は一定であった。

③尿蛋白；A群において2羽に硝酸鉛投与前より(+)のものがあり、内1羽は実験期間中、終始その消失をみず、1羽は投与後第2日目まで出現し、以後消失して第7日目にいたり再び出現し、第8日目にもみられた。その他2羽に実験期間の前半に(+)のものがあつたが、後半には消失した。B、C群にてはその出現をみず、D群には投与前より1羽に(++)のものがあつたが、第1日目にその消失をみ、2羽に第1日目に(+)をみ、一時的に強くなったが、第6日目には消失し、その他一過性に(+)をみたのもあつた。

全体的にみてD群の尿蛋白出現はA群よりは少なく、B、C群よりは多かつた。

④尿中ウロビリノーゲン；A群においては、第2日目より4日間、第3日目より5日間各々1羽に病的に出現したが、第8日目にはいずれも正常に復した。他群はいずれも正常であった。

⑤尿糖；各群とも正常であつた。

⑥尿潜血反応；各群とも正常であつた。

⑦尿中コプロポルフィリン；投与前は各群ともその出現をみるものではなく、硝酸鉛の投与により各群とも第1日目よりその出現をみ、ことにA群において強く、第2日目はさらに強くなり、第3日目以後は弱くなるが、実験期間中その消失をみなかった。D、B群はその程度は弱い、第4日目まで、C群は最も弱く第2日目まで出現した。

D. 尿中への鉛排泄量：

尿中に排泄される鉛濃度については、投与前はA群の平均値は $0.1119 \mu\text{g/ml}$ で各群間に有意な差はなく、硝酸鉛の投与により各群の濃度は高まり、C、B群は第1日目に最高濃度となり、以後急激に低下し、第4日目より漸減していくが、D群は第1日目より第2日目、それより第3日目と高濃度になり、第4日目が最高で以後、次第に低下していく。1群は第1、2、3日目にやや高い濃度になるが、全体的に低い。これは増減率よりみても全く同様のことがいえた。

Fig. 5. Daily Excreted Amount of Lead in the Urine (rise and fall rates of each group)

分散分析の結果では各群間に有意の差がみられ、第1日目においてはC、B群の間に有意の差はないが、他群に比し高い濃度となり ($p < 0.01$)、第4、5、6日目になるとD群が他群よりも高く ($p < 0.01$)、また第4日目ではB群もC、A群より高くなり ($p < 0.01$)、第7、8日目では各群間に有意の差はみられなかった。

1日間に尿中に排泄される鉛の総量については Fig. 5 に示したとおりである。投与前はA群の平均値は $25.63 \mu\text{g/day}$ で各群間に有意な差はなく、硝酸鉛の投与により各群の鉛排泄量は多くなり、C群は第1日目に最も多量排泄し、以後第2、3日目と急激に減少し、第4日目より漸減していく。B群も第1、2日目と著しく増加し以後減少していく。D群は2峰性を示し、第2日目と第5日目に各々頂峰を有し、第6日目よりは著しく排泄量が減少する。

分散分析すると各群間に有意の差がみられ、第1日目においては、C群が他群に比し多い排泄量を示し ($p < 0.01$)、第4日目においては、D、B群の間には差はないが、他群に比し有意に多く ($p < 0.01$)、第5、6日目においてはD群は他群に比し、第5、6、7日目においてはB群はC、A群に比しいずれも多く排泄した ($p < 0.01$) が、第8日目には有意の差はなかった。

8日間の尿中鉛排泄量の総計をみると、A群は $881.70 \mu\text{g/8 days}$ 、B群 $4,482.47 \mu\text{g/8 days}$ 、C群 $3,388.39 \mu\text{g/8 days}$ 、D群 $3,841.30 \mu\text{g/8 days}$ であり、各々対照群より著しい鉛の尿中排泄量をみ ($p < 0.01$)、D.M.S.投与群はBAL投与群よりは少ないが、Ca-EDTA投与群より多い排泄量を示した。

II. 水銀の排泄促進作用

A. 体重の変化：(Fig. 6)

投与前はA群の平均値は $2,200.4 \text{ g}$ で各群間に有意な差はなく、硝酸水銀の投与により各群の体重増加はとまり、A群は体重の減少傾向が続く、実験期間中その回復をみないが、B、C、D群は第6日目に最低値を示し、以後徐々に増加している。

この傾向は増減率よりみても全く同様のことがいえた。しかし、各実験日において各群の体重減少には有意の差はみられなかった。

B. 血液所見：

①赤血球数；(Fig. 7) 投与前はA群の平均値は 615.2×10^4 で各群間に有意な差はなく、硝酸水銀の投与により24時間後には赤血球数は激減し、A群は減少が続き実験期間中その回復をみないが、B群は第2日目より、C群は第3日目より、そしてD群は第5日目より徐々に回

Fig. 6. Body-Weight (rise and fall rates of each group)

Fig. 7. Counts of Red Blood Corpuscles
(rise and fall rates of each group)

復している。

この傾向は増減率よりみても同様のことがいえた。

実験各日についての分散分析の結果では、各群の赤血球の増減には有意の差がみられ ($p. 0.01$)、第1日目ではD群が最も小さい減少を示し ($p. 0.01$)、他群間では有意の差はみられなかった。第2日目ではD、B群間には有意の差はみられぬが、A、C群よりは多く ($p. 0.01$)、第4日目になるとB群がD、C群より有意に多くなり ($p. 0.01$)、以後ほぼ同様の経過をとって、第10日目ではA群に比し他の3群は著しい回復ぶりを示した ($p. 0.01$)。

②血色素量; (Fig. 8) 投与前はA群の平均値は83.6%で各群間に有意な差はなく、硝酸水銀の投与により24時間後には激減し、A群は減少を続け実験期間中その回復をみないが、B群は第2日目より、C群は第3日目よりそしてD群は第5日目より徐々に回復している。

Fig. 8. Hemoglobin (rise and fall rates of each group)

この傾向は増減率よりみても同様のことがいえた。

分散分析の結果では、実験各日において各群の血色素量の増減には有意の差がみられ ($p. 0.01$)、第1日目ではA、D群の減少はB、C群より少なく ($p. 0.05$)、第2、3日目ではB群が回復し始めたので、A、B、D群はC群より少なくなり ($p. 0.05$)、第4日目になるとB群は他群より多い血色素量となり ($p. 0.01$)、以後同様の経過をとって、第8日目にはB、C、D群はA群より多くなり、以後実験期間中同様の経過をとった。

③好塩基点赤血球数; 投与前は各群ともその出現をみず、硝酸水銀の投与にてもその出現は非常に少なく、A群においては第3日目にも最も著しくみられ、以後漸減の傾向にあり、第6日目にはその消失をみた。他群におい

てはほぼ同様の経過をとり、B、C群は第5日目より、D群は第4日目よりその出現をみなくなった。

全経過を通じてD群における出現が最も弱い傾向にあった。

C. 尿所見:

①尿量; 投与前はA群の平均値は 262.2 ml/day で、各群の平均値でみると硝酸水銀の投与により、A群では第1、2日目には尿量は激減し、第3日目よりは漸減していき、B群は第1日目にはやや増加するが、以後第3日目にはほぼ投与前の尿量に戻り、第5日目まで激減し第7日目までは漸減して、以後尿量も増加の兆をみせるが、第10日目にはまた減少している。C群は第3日目まで漸減し以後徐々に増加し、第10日目にはほぼ投与前の尿量に復している。D群は尿量の変動は少なく、投与前の尿量と差はなく、実験期間中の総排泄量は最も多かった。

分散分析の結果では、実験各日において各群の尿量の増減には有意の差がみられ、第1、2、3、4、5日目においては、D、B、C群はA群に比し明らかに小さい尿量の減少であり (p. 0.01)、第6日目よりはC群の尿量が増加しはじめ、第9、10日目ではD、C群の尿量の増加とB、A群の減少との間には有意の差がみられ (p. 0.01) B群とA群の間にも同様有意の差がみられた (p. 0.01)。

②尿の pH; 投与前のA群の平均 pH 値は 8.8 で、硝酸水銀の投与前も投与後も各群間に有意の差はみられなかった。投与前後も pH 8~9 の間にあり、A群は第1日目よりやや低下する傾向にあるが、第4日目より徐々に旧に復する兆をみせ、第5日目よりは一定していた。他群はほぼ安定しており、ことにD群では第4日目より pH は一定していた。

③尿蛋白; 各群とも硝酸水銀投与前には尿蛋白の出現をみず、投与後A群にては第1日目よりその出現を軽度のみ、第2日目より第5日目まで中等度に出現し、第6日目より軽度になるが、実験期間中その消失をみなかった。B群でも第1日目より軽度に出現し、第2日目に中等度となり、第4日目にいたり軽度となり、第5日目以後きわめて軽度になり、第7日目以後はその出現をみなかった。C群では、第1日目に中等度にみられ、第3日目にいたり軽度の出現となり、第6日目よりきわめて軽度となって、第8日目以後その消失をみた。D群では、第1日目に軽度に出現するが、第3日目にいたりきわめて軽度となり、第4日目よりその出現をみなかった。

④尿中ウロビリノーゲン; 各群とも正常であった。

⑤尿糖; 各群とも正常であった。

⑥尿潜血反応; 投与前は各群ともその出現をみるものではなく、硝酸水銀の投与により各群とも第1日目にその出現をみ、ことにA群においては強く、第1、2日目においては中等度の出現をみ、以後軽度ながら第7日目までみた後第8日目よりその消失をみた。B群は軽度で、第4日目までみたが、第5日目より消失し、C群はA群について多い出現をみ第2日目まで中等度に、第3、4日目は軽度にみられ、第5日目よりその消失をみた。D群は、第1日目には軽度の出現をみたが、第2日目にはきわめて軽度となり、第3日目からはその出現を全くみなくなった。

⑦尿中コプロポルフィリン; 投与前は各群ともその出現をみるものではなく、硝酸水銀の投与により各群とも第1日目にその出現をみ、ことにA群において強く、第2日目にはさらに強くなって中等度の出現となり、第5日目までは同程度の出現を続け、第6日目よりはその出現は弱くなり、第7日目より軽度の出現となるが、実験期間中その消失はみなかった。B、C群では、第1日目に軽度に出現し、第2日目においてやや強くなるが、第3日目には弱まり、第4日目にはごく軽度となり以後その出現をみなかった。D群では、第1、2日目に軽度に出現し、第3日目には弱くなり以後その出現をみなくなった。

D. 尿中への水銀排泄作用

尿中に排泄される水銀濃度については、投与前はA群の平均値は 0.0140 $\mu\text{g/ml}$ で各群間に有意な差はなく、硝酸水銀の投与により、各群の濃度は高まり、C、B群は第1日目に最高濃度となり以後急激に低下し、C群は第4日目、B群は第5日目よりそれぞれ漸減していくが、D群は第1日目より第2日目と高濃度になり、第3日目においてやや低下するが、第4日目が最高濃度で以後次第に低下していく。A群は第1日目にやや高い濃度になるが全体的には低い濃度である。増減率ならびに分散分析の結果では、各群間に有意の差がみられ、第1日目においてはC群が最も高い濃度を示し (p. 0.01)、ついでB群 (p. 0.01)、D群 (p. 0.01) の順で、A群は最も低く、第2日目においてはB群の濃度は高いが、B、C、D群間には差はみられない。しかしA群よりは高く (p. 0.01)、第3日目においては、D群の濃度は高くなるが、B、D群間には有意な差はなく、C群よりは高くなり (p. 0.01)、C群はA群よりは高い排泄量をみた (p. 0.01)。第4日目になるとD群が最も高濃度になり (p. 0.01)、ついでB群 (p. 0.01)、A群 (p. 0.01)、そしてC群の順となり、C群の濃度は対照群より低くなった。第

5日目には、D、B群は各々濃度は低くなるがD群の濃度が高く (p.0.01), C群の濃度もA群より高くなった。第6日目には、B、D群はさらに濃度は低下するが、B群の濃度が高い傾向にあり、第7日目以後B、C、A群に差はなくなり、D群は明らかにこれら3群より高く、第10日目には、D群は3群より高い濃度であるが、B、C、A群間には有意の差がみられた (p.0.01)。

1日に尿中に排泄される水銀の総量については、Fig. 9に示したとおりである。投与前はA群の平均値は3.65

Fig. 9. Daily Excreted Amount of Mercury in the Urine (rise and fall rates of each group)

$\mu\text{g/day}$ で各群間に有意な差はなく、硝酸水銀の投与により各群の水銀排泄量は多くなり、B、C群は第1日目に最も多量排泄し、B群は第5日目まで、C群は第4日目まで急激に減少し、以後漸減していく。D群は軽い2峰性を示し、第2日目と第4日目に各々頂峰を有し、第

6日目には著しく排泄量が減少し、以後実験期間中漸減していった。A群の排泄量は全般的に著しく少なく、第1日目より第4日目まではやや多かった。分散分析の結果では各群間に有意の差がみられ、第1日目においてはC、B群間に差はないが他群より多く排泄され、D、A群間にも有意の差がみられた (p.0.05)。第2、3日目においては、D群の排泄量は増加するがB、D、C群間に有意の差はみられず、第4、5日目にはD群が最も多い排泄量を示し (p.0.01), B群 (p.0.01), C群 (p.0.01) と続き、第6日目にはD群の排泄量は激減するが前日と同様の傾向がみられ、第7、8日目においてC群がB群といれかわるが有意の差はなく、第9日目にいたり再び第6日目と同じ傾向になり、第10日目も同様であった。

10日間の尿中水銀排泄量の総計をみると、A群は $421.02 \mu\text{g}/10 \text{ days}$, B群 $1,598.37 \mu\text{g}/10 \text{ days}$, C群 $1,418.18 \mu\text{g}/10 \text{ days}$, そしてD群は $1,869.33 \mu\text{g}/10 \text{ days}$ であり、各々対照群より著しい水銀排泄量を示し (p.0.01), D.M.S. 投与群は BAL, Ca-EDTA 投与群のいずれよりも多い排泄量をみた。

考按ならびに総括

Meso 型 D.M.S. が、生体内に入った重金属ことに鉛と水銀を抱合して排泄し、中毒症状を軽減するであろうことは予想されているが¹⁸⁾, 実際に実験的検討を試みたものは少なく、僅かにイタリアの Cannavà¹⁹⁾ 一派により、その物理化学的、薬理学的研究の中で重金属のうちでも、ことに鉛中毒の拮抗物質としてのすぐれた性質をみられているにすぎない。しかし、そのキレート能については、試験管内で電位差滴定法により実験的に測定されており、Ca や Cu などとの結合はきわめて弱く、生体内必須微量元素を貧困化せしめることはないと推察される^{20,21)}。著者は、現在までの D.M.S. に関する各種知見を総合的に検討し、これを鉛ならびに水銀中毒の解毒に応用する意義もあると判断し、本実験を計画した。しかし本実験では、重金属中毒の本態に関連した D.M.S. の作用機作を追求するというよりも、重金属を投与した実験動物の尿中に排泄される重金属の量つまり、D.M.S. の重金属尿中排泄作用の比較検討を中心にし、併せて体重、尿、血液の各所見の変化におよぼす影響を検討し、重金属の生体内侵入に対処する生体側の反応を吟味したものである。

まず実験条件であるが、同じ投与方法で等量の重金属を投与した場合、各実験動物の個体差を含めて等質に中毒し、症状は体重、尿および血液の所見にも等質の変化

を惹起することを仮定し、さらに D.M.S., BAL および Ca-EDTA を投与することによって、それぞれの予防乃至金属排泄効果に相応した症状が発現するであろうことを前提として、本実験を企画した。かねて有効とされている BAL, Ca-EDTA の効果と D.M.S. の作用とを比較し、とくに尿中への金属排泄量が効果の主なるものであり、それが多い場合には原則としてその他の中毒症状も軽くすむはずである。

労働衛生学的な鉛・水銀の主な侵入経路は、経気道的でありついで経口的である²²⁾。しかし、実験的には皮下注射により急性中毒をおこさせる方がよいので、中等度の中毒をおこす量を投与したわけである。

D.M.S. はきわめてわずかな毒性しか示さない。BAL²³⁾および Ca-EDTA²⁴⁾のそれと比較しても著しく高いとはいえない。今回使用した pH 中性での D.M.S. のマウスによる LD₅₀ では、Probit 法で 3,132 mg/kg (±44)であり、これは館ら²⁰⁾の報告とほぼ一致する。

急性中毒をおこさせたマウスの逐時観察実験の結果から、2.8 g/kg までは全く被検動物に異常がなく、2.9 g/kg になると一時的ながら僅かに異常を認め、3.0 g/kg ではさらにそれが強くなる。深呼吸と交互にくる呼吸困難の発作、挙尾、瞳孔散大および短い痙攣発作が死の直前に先行する。この時の痙攣は強直性一過代性型のものであって、その反覆は重篤であり、その間隔はいつも短い。3.1 g/kg 以上投与の場合には、立毛、身体の動揺、チアノーゼ、下肢や咬筋の選ばれた部位の強直性一過代性の痙攣発作の反覆などで、死の直前での症状は一般に抑制的である。つまり死亡直前期には呼吸は少なくなり、横臥し眼をつむってしまい、もしも刺激を与えると筋肉が攣縮する。毛はしばしば浸潤となる。瀕死期には尿尿の失禁がある。死は一般に22~24時間後にくる。以上のごとき中毒症状は、注射直後から数分で始まる。Cannavà らによると¹²⁾、D.M.S. 5% 溶液を 1 ml/30秒の速度で経静脈的に兎に投与すると、2.70~2.85 g/kg の用量(但しマウスによる LD₅₀ は、pH 中性で10%溶液の場合 1,725 mg/kg (±5)である)で動物を死にいたらしめるといい、著者の皮下投与の場合とほぼ大差ない毒性の諸症候をみている。

鉛に関する解毒では、鉛は単独で著しい貧血とそれに相応した体重減少を惹き起すのであるが、D.M.S. を投与した動物では、貧血の回復がかなり早く、また体重の減少も Ca-EDTA 以上に小さかった。血液像は、わずかながら好塩基点赤血球を認め、対照動物では実験期間中その消失をみず、D.M.S. を投与した兎では、第6日

目より消失してしまった。Cannavà¹²⁾らも貧血の防止を認めている。対照群の兎では、巨大細胞を沢山伴った典型的な赤血球の中毒症状を示し、一部には過色素性の小球状赤血球の著増、赤血球の形態変化、好塩基点赤血球、標的状赤血球様のもの、全体として多染性の赤血球がみられるのに反し、D.M.S. を投与された兎では、ほとんど正常な赤血球像を示し、稀れに小球性赤血球や極めて軽い低色素性貧血が観察されたのみであった。また、体重減少の防止作用については、かえって体重を増加させる作用を持っているとさえいわれている。

尿所見としては、尿量、pH、尿蛋白、尿中ウロビリノーゲン、尿糖、尿潜血反応および尿中コプロポルフィリンを調べた。尿量については、対照群は実験期間中の総量では最も少なく、D.M.S. を与えられたものは最も多い。つまり尿量の減少を防止する傾向がみられる。尿蛋白の出現は、BAL 投与群や Ca-EDTA 投与群の方がむしろ D.M.S. 投与群より出現が少ない傾向にあった。尿中コプロポルフィリンは、Ca-EDTA 投与群の方がその出現が軽かった。pH、尿中ウロビリノーゲン、尿糖、尿潜血反応では、いずれも異常所見を認めなかったが、総じて腎障害の程度は、Ca-EDTA の場合にはほぼ匹敵する程度である。尿中に排泄される鉛量については、Ca-EDTA 投与群は第1日目に最も多量排泄し、以後第2、3日目と急激に減少し、それ以後は漸減していく。D, M.S. 投与群では、第2日目と第5日目に各々頂峰を有する2峰性を示し、第6日目よりは排泄量は漸減する。実験期間の総排泄量をみると、Ca-EDTA 投与群よりは多いが、BAL 投与群よりは少ない排泄量であった。全体的にみて、D.M.S. の鉛排泄効果は漸進的によりくなり、比較的早期に終了するが、投与後早期に多量排泄する Ca-EDTA, BAL とは趣を異にしている。

水銀に対する解毒では、鉛の場合と同様、対照群では水銀による貧血の典型的な病像が観察されたのに対し、D.M.S. を与えられた兎では貧血からの回復が早い。しかし、各群の貧血に相応した体重減少は鉛の場合に比べて大きかった。血液像は、わずかながら好塩基点赤血球を認めたが、対照群でも第6日目には消失した。全経過を通じて、D.M.S. を与えた症状が最も弱い傾向がみられた。

尿所見としては、尿量は対照群に比し D.M.S. 投与群は明らかに小さい減少を示した。実験期間中の総排泄量では対照群が最も少なく、D.M.S. 投与群は最も多かった。すなわち水銀の場合でも尿量の減少を防止していた。尿蛋白、尿潜血反応、尿中コプロポルフィリンの何

れも D.M.S. 投与群において軽い傾向にあり、pH, 尿中ウロビリノーゲン、尿糖などは正常であった。総じて、腎障害の程度は Ca-EDTA のそれよりやや小さい傾向にあった。尿中に排泄される水銀については、鉛の場合と同様、D.M.S. の効果は第 1 日目より第 2 日目と漸進的に高濃度になり、第 3 日目においてやや減少するが第 4 日目には最も高くなり、以後次第に低下していく。実験期間中の尿中水銀総排泄量では、D.M.S. 投与群は他群のどれよりも多い排泄量であった。

以上のごとく、ほとんどすべての実験を通じて、鉛および水銀投与動物の D.M.S. を与えられた場合において得られた成績は、鉛の場合では Ca-EDTA を与えられた場合において得られた成績に匹敵するものであり、水銀の場合では優るとも劣るものではない。

重金属の予防乃至治療は、生体内に侵入した重金属を体外に排出させるのが最も良い。重金属中毒に対する D.M.S. の効果は、投与後比較的早期からみられる点、2-Mercaptoethylamine の場合と酷似していた²⁵⁾。

キレート剤が有害金属や放射性同位元素の解毒に実際にもちいられるためには、つぎの条件に一致していなければならない²⁶⁾。

1. キレート剤と目標の金属がキレートを生成すること。
2. 生体内の物質の Ca などとの結合が比較的に小であること。
3. キレート剤が目的の金属と生体内で接することができること。
4. 組織内でキレート反応を妨害する他の化学反応のないこと。
5. 生じた金属キレートが排泄され易いこと。
6. キレート剤が代謝され難いこと。
7. 一般に毒性が低いこと。
8. そしてその薬物が実際にもちいられるために調整・滅菌操作が容易で、安価で経時変化が少なく、経口投与可能であることなどである。これらのうちまず 1. については館ら²⁰⁾によって 2. については Cannavà¹²⁾ らによって各々認められており、3. はすなわち金属の生体内分布とキレート剤の細胞膜透過性の問題であるが、概して金属解毒にもちいられるキレート剤は水溶性であって、細胞膜透過性は低い。このため、組織・器官などに沈着したものはキレート剤と接し難くなり、排泄も弱くなる共通の欠点を持つものである。4. 5. については、今回の動物実験よりみて、金属キレートが低分子で水溶性拡散性であるために、腎透過性が大となり、かつ金属が

蛋白と強い結合物を作って阻害されてしまうことのないことを十分に推定せしめ、また 6. については、他群に比べ排泄効果の持続性が著しい点よりみて、D.M.S. は代謝され、他の物質に変えられたり、あまり速やかに排泄されたりすることは少ないと考えられる。そして 7. の毒性については前述のとおり少ない。8. については、経時変化が大きいことが難点としてあげられる。もとより、以上の諸条件をすべて満足する理想的なキレート剤は存在しない。Ca-EDTA がこれに近いといわれていたが、D.M.S. についてはさらに検討を加える必要があるが、あるいは Ca-EDTA に近い効果を持つかもしれない。ともかく、動物実験、臨床実験の資料の集積を特になくしてはならぬが、Ca-EDTA ならびに目下開発中の同系統の DTPA²⁶⁾ (Diethylene Triamine Pentaacetic Acid) に匹敵する重金属ことに鉛ならびに水銀に対する排泄作用があるといえよう。

結 論

重金属中毒に対する D.M.S. の効果について動物実験により検討した。実験は、マウスによる LD₅₀ の測定と、鉛および水銀投与家兎の体重、血液所見、尿所見および尿中への鉛および水銀の排泄量などによろぼす D.M.S. の影響を指標として、BAL, Ca-EDTA および対照と比較して、とくに D.M.S. の効果の判定をおこない、つぎのごとき結論を得た。

(1) 今回使用した pH 中性での D.M.S. のマウスによる LD₅₀ は、Probit 法で 3,132 mg/kg (±44) であった。

(2) 急性中毒をおこさせたマウスの逐時観察実験の結果から、2.8 g/kg までは全く被検動物に異常がなく、2.9 g/kg になると一時的ながら僅かに異常を認め、3.0 g/kg ではさらにそれが強くなる。深呼吸と交互にくる呼吸困難の発作、挙尾、瞳孔散大および下肢や咬筋の特定部位の短い痙攣発作が死の直前に先行する。この時の痙攣は強直性——間代性型のもので、その反復は重篤であり、その間隔はいつも短いものである。その他立毛、身体の動揺、チアノーゼ、横臥などで、死の直前での症状は一般に鎮静的である。

(3) 家兎の体重変化は、D.M.S. 投与群の体重減少が小さかった。ことに鉛中毒の場合は、Ca-EDTA 投与群以上に有効な成績を得た。

(4) 血液所見では、D.M.S. 投与群では貧血の回復が早くみられ、好塩基点赤血球の出現は弱く、その消失も早い傾向にあった。

(5) 尿所見では、D.M.S. 投与群では尿量の減少を防止

しており、ことに水銀中毒の場合にその防止作用が強かった。腎障害の程度は、鉛中毒の場合ではBAL投与群、Ca-EDTA投与群の方がやや軽い傾向にあるがそれらに匹敵しており、水銀中毒の場合では、D.M.S.投与群が最も軽い傾向にあった。

(6)D.M.S.の金属排泄作用は、第1日目より第2日目と漸進的に高濃度になり、比較的早期に終了するが、投与後早期に多量排泄するCa-EDTA、BALとは趣を異にしている。実験期間中の総鉛排泄量では、Ca-EDTA投与群よりは多いが、BAL投与群よりは少なかった。総水銀排泄量では、他群のどれよりも多い排泄をみた。

稿を終えるに臨み、終始御指導をいただいた西川眞八教授に謹んで感謝の意を表します。

また、D.M.S.提供を受けた森下製薬株式会社・柴崎健三博士に謝意を表します。

尚、本研究の一部は昭和40年度文部省科学研究費（総合研究）の補助をうけた。深く謝意を表します。

本論文の要旨は、昭和41年4月8日第39回日本産業医学会総会ならびに昭和42年4月4日第17回日本医学会総会衛生関係六分科会連合学会において発表した。

文 献

1. Fister, E.: *Journal of Pediatrics*, 52 (6); 1958.
2. Iremer, K.B. and Seldinger, S.I.: *Acta Radiol.*, 48 (5); 366, 1951.
3. 黒田 健: 第33回日本産業医学会, 於信大, 1960.
4. Tebrock, H.E. and Mache, W.: 5th Internal. Congr. on Dis. of Chest.; sept. 7~11, 1958.
5. 鈴木継美, 小泉明: *医学のゆあみ*, 29; 622, 1959.
6. Gerecke, M., Friedheim, E.A.H. e Brossi, A.: *Chimia*, 14; 174, 1960.
7. Owen, L.H. e Sultanbawa, M.U.S.F.: *Chem. Soc.*, 3109, 1949.
8. Friedheim, E.A.H.: *Brist. Pat.*, 716, 647, dell' 8, 4, 1952.
9. Friedheim, E.A.H. Da Silva, JRe Martins, A.V.Am.: *F. Trop. Med. Hygiene* 3; 714, 1954.
10. Friedheim, E.A.H.: *Annals Trop. Med. Parasit.*, 51, 1, 1959.
11. Cugurra, F. e Balestra, E.: *Boll. Soc. Ital. Biol.*, 39, 8~11, 1963.
12. Cannavà A. e Cugurra, F.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*; 131, 297~298, 1961.
13. 佐藤徳郎, 福山富太郎: *化学の領域*, 増刊47号; 21~28, 1961.
14. 多田 治: *労働科学*, 33(9); 669~674, 33(11); 850~861 1957.
15. Natelson, S.: *Microtechniques of Clinical Chemistry* 2nd. Ed.; 294, Charles, C. Thomas, Publisher, 1961.
16. 藤村 豊: *日本衛生学雑誌*, 17 (6); 239, 1963.
17. 鳥居敏雄・他: *医学生物学のための推計学附表*; 東京大学出版会, 東京, 1954.
18. Wang Shih-chau, Ting Kuang-sheng and Wu Chih-chung: *アジア国際産業医学会抄録*; *Chelating Therapy with Na-D.M.S. in Occupational Lead and Mercury Intoxication*, 1964.
19. Cannavà, A. e Cugurra, F.: *Arch. Int. Pharmacodyn.*; 131, 295~296, 1961.
20. 館 正和・他: *産業医学* 8 (3); 191, 1966.
21. Baccari, E., Bianchi, C. and Felder, E.: *Arzneimitt Forsh*, 5; 421, 1955.
22. 堀口俊一: *阪市大医学雑誌* 6; 68, 1957.
23. 梶井 直: *日本公衆衛生学雑誌* 6(6); 292, 1959.
24. Manville, I.A. and Weir, R.B.: *Arch. Ind. Hlth.* 12; 529, 1955.
25. 黒田 健: *岡山医学雑誌* 72(5~7); 1521, 1960.
26. 坂口武一・他: *金属キレート* 3; 226~263, 南江堂, 東京, 1967.