マウスにおけるチメロサルの実験病理学的研究（第一報）

衛藤光明 加藤博史 佐々木次雄 佐々木裕子

国立予防衛生研究所安全性研究部

徳永英博 岩崎浩子

熊本大学医学部病理学第二講座

須田郁夫

農林水産省九州農業試験場作物開発部

PATHOLOGICAL STUDY OF THIMEROSAL IN MICE (1st Report)

Komyo Eto, Hiroshi Kato, Tsuguo Sasaki, and Yuko Sasaki

Department of Safety Research on Biologics, Center for Biologics Control and Research, National Institute of Health

Hidehiro Tokunaga and Hiroko Iwasaki

Second Department of Pathology, Kumamoto University Medical School

Ikuo Suda

Department of Crop Breeding, Kyushu National Agricultural Experiment Station, Ministry of Agricultural Forestry and Fisheries

Abstract : Thimerosal (ethylmercuric thiosalicylic acid, sodium salt) in an organic mercury compound which has been used as a preservative in some vaccines and human immunoglobulin products for intramuscular use.

This study was designed to examine the safety of thimerosal for mice. Thimerosal solutions of 0.2 ml at 0.01% (the concentration used in vaccines) or at 0.1% were injected twice a week into the intraperitoneal (IP) cavity or subcutaneous (SC) tissue of BALB/c mice. Clinical signs and symptoms such as crossing hind legs were observed in animals injected more than 17 times with the 0.1% thimerosal solution (total thimerosal dose; 70 μ g Hg/g body weight) into the IP cavity. But the IP administrations of 0.01% thimerosal did not effect the animals even after 35 injections, nor the SC administrations at any dose. At autopsy, nervous system, kidney, liver, heart, lung, spleen, intestine, and skin were examined under light-microscopy with hematoxylin and eosin stain and mercury-histochemistry by photoemulsion method. Peritonitis was observed in all animals that received IP injections with 0.1% thimerosal. Mercury granules were present in the kidney and spleen of the animals receiving IP injections of 7 μ g Hg/g body weight. Histochemically, mildly positive reaction to mercury was detected in the brain and the liver in the same group of mice. No peritonitis was found in this group of mice. The positive results observed in this series of experiments were obtained only with multiple injections of the high dose thimerosal solution. No toxic effects were found with the 0.01% dose, which is the same concentration used in commercial vaccines. Thimerosal administered in mice was biotransformed into inorganic mercury, and it was readily degraded into inorganic mercury by four well-known reactive oxygen-producing systems, and the amounts of inorganic mercury produced from thimerosal were the

Accepted for publication : May 27, 1993

Mailing address : Komyo Eto, Department of Safety Research on Biologics, National Institute of Health, 4-7-1 Gakuen Musashimurayama, Tokyo 208, Japan.

same as those from ethyl mercury and were higher than those from methyl mercury. (J Toxicol Pathol 6: 233~240, 1993)

Key words: Thimerosal, Preservative, Vaccine, Reactive oxygen, Biotransformation

緒言

チメロサル（エチル水銀チオサリチル酸ナトリウム）は種々の不活化ワクチンや筋注用免疫グロブリン製剤中に防腐剤として使用されている有機水銀化合物である。有機水銀化合物は摂取経路にかかわらず、体内蓄積性を招来する重金属であり、神経系障害を特異とする毒物であることは、既にヒト水俣病（メチル水銀中毒）¹⁻¹⁰ および実験的有機水銀中毒症の報告^{5,6} 等で周知の事実である。チメロサル含有ワクチンが幼小児に頻回に投与されるので、その安全性を検討する目的で、チメロサル頻回投与によるマウスの諸臓器における水銀蓄積性を調べた。さらにチメロサルが無機水銀へ分解される速度をエチル水銀およびメチル水銀のそれと比較したので報告する。

研究材料と方法

チメロサルの急性毒性実験の目的で、BALB/c 雌マウス、7 週齢（24 g）の腹腔内に Hg 量で 1 mg/kg（第 1 群）、2.5 mg/kg（第 2 群）、5 mg/kg（第 3 群）を 1 回投与し、生理食塩水を投与した対照群の 2 匹と共に観察した。

屠殺はエーテル麻酔下で行われ、生理食塩水約 20 ml 灌流後、10% ホルマリン約 20 ml を灌流して固定した後、大脳、小脳、肝臓及び腎臓について水銀組織化学反応を行った。

チメロサル頻回投与実験は、BALB/c 雌マウス、実験開始時 5 週齢を使用し、週 2 回 0.01%、0.1% チメロサル水溶液を 0.2 ml 腹腔内（IP）および背部皮下（SC）に注射した。本実験に使用した 0.1% チメロサル 0.2 ml 中には、水銀が 98.68 μg （そのうち無機水銀が 1.54 μg ）含まれている。対照には生理食塩水を使用し、それぞれ 5 匹を一群とした。

0.1% チメロサル腹腔内投与 17 回投与の一週間後、また、24 回投与 3 日後にそれぞれ 0.1% チメロサル投与群、0.01% チメロサル投与群および対照群の中から一匹を屠殺した。さらに 0.1% チ

メロサルを腹腔内に 35 回投与後に発症した 2 匹のマウスおよび残ったマウス全てを 5 日後に屠殺した。発症後にはチメロサルは投与していない。

前述したと同様の方法で屠殺、解剖して神経系、腎臓、肝臓、心臓、肺臓、脾臓、腸管、注射部皮膚について Hematoxylin-Eosin 染色及び酒井らの方法の改良法¹¹ で水銀組織化学反応を行い、その陽性臓器の水銀定量を行った。水銀定量は総水銀値と無機水銀値を測定した。総水銀値は五酸化バナジウム-硝酸-硫酸-過酸化水素法による湿式灰化後、塩化スズによる還元気化、金アマルガムへの補集の後に平沼式水銀計を用いて測定した¹²。無機水銀値の測定は小西・高橋による無機水銀直接定量法¹³ を用いた。

活性酸素系のチメロサル分解能については Myeloperoxidase (MPO)-過酸化水素 (H_2O_2)- Cl^- 系¹⁴、Xanthine oxidase (XOD) - Hypoxanthine (HPX) - Ferric monosodium ethylenediamine-tetracetate (Fe(III) EDTA) 系¹⁵、Phorbol myristate acetate (PMA) 刺激好中球、PMA 刺激マクロファージ¹⁶ の 4 つの系を用いて調べた。

研究成績

1. 急性毒性試験

急性毒性試験の成績を Table 1 に示した。第 3 群は注射後 2 時間、第 2 群は注射後 5 日間で死亡した。第 1 群は生存したので 16 日後に屠殺した。水銀組織化学反応は、第 3 群の 1 例で脳室上衣にわずかな陽性反応を見たがその他の臓器では陰性であった。第 2 群の大脳には 2 例ともに陽性反応があり、肝臓に軽度、腎臓に強度の陽性反応を見た。第 1 群の大脳基底核及び腎臓に陽性反応があったが小脳及び肝臓では陰性であった。また、対照群は全て陰性であった。

2. 頻回投与試験

チメロサルの反復投与による各臓器における水銀組織化学反応の有無およびその程度を Table 2 に示した。0.1% チメロサルの頻回投与での水

Table 1. Histochemical Reaction of Mercury in the Cerebrum, Cerebellum, Liver, and Kidney of the Experimental Mice in an Acute Intoxication Test of Thimerosal

Group	Route	Dose (mgHg/kg)	Survival time	Cerebrum	Cerebellum	Liver	Kidney
1-A	IP	1.0	killed at 16 days	1*	0	0	1
1-B				1*	0	0	1
2-A	IP	2.5	5 days	1**	0	1	3
2-B				1**	0	1	3
3-A	IP	5.0	2 hours	0	0	0	0
3-B				1**	0	0	0
Cont-A	IP	saline	killed at 16 days	0	0	0	0
Cont-B				0	0	0	0

Cont: Control

*Basal nucleus

0: Negative

IP: Intraperitoneal

**Ependymal cell

1: Slightly positive

3: Extremely positive

Table 2. Histochemical Reaction of Mercury in the Organs of Experimental Mice and the Appearance of Mercury Intoxication and Peritonitis

Group & Route	Dose $\mu\text{gHg/g}$	Cerebrum	Cerebellum	Pons	Spinal cord	Liver	Kidney	Spleen	Heart	Lung	Intestine	Skin	Clinical sign	Peritonitis
A-IP-1	70	2	2	2	2	2	3	2	2	0.5	1	nd	P	P
A-IP-2	100	2	2	2	2	2	3	2	2	0.5	1	nd	P	P
A-IP-3	140	3	3	3	3	2	2	2	2	0.5	1	nd	P	P
A-IP-4	140	3	3	3	3	2	2	2	2	1	1	nd	P	P
A-IP-5	(78)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	ne
A-SC-1	140	3	3	3	3	2	3	3	2	1	0	0	N	N
A-SC-2	140	3	3	3	3	2	3	3	2	1	0	0	N	N
A-SC-3	140	3	3	3	3	2	2	3	1	1	0.5	0	N	N
A-SC-4	140	3	3	3	3	2	2	3	1	1	0.5	0	N	N
A-SC-5	140	3	3	3	3	2	2	3	1	1	0.5	0	N	N
B-IP-1	7	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0	0	0	nd	N	N
B-IP-2	10	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0	0	0	nd	N	N
B-IP-3	14	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0	0	0	nd	N	N
B-IP-4	14	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0	0	0	nd	N	N
B-IP-5	14	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	1	0	0	0	nd	N	N
B-SC-1	14	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0	0	0	0.5	N	N
B-SC-2	14	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0	0	0	0	N	N
B-SC-3	14	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0	0	0	0	N	N
B-SC-4	14	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0	0	0	0	N	N
B-SC-5	14	0	0	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0	0	0	0	N	N

IP: Intraperitoneal

0: no reaction

1: Slightly positive

3: Extremely positive

P: Positive

SC: Subcutaneous

0.5: Subtly positive

2: Moderately positive

nd: not done

N: Negative

銀組織化学反応は、腹腔内投与と皮下投与とでその差を認めなかった。しかし、腹腔内投与した群のみに後肢屈曲交差現象 (Fig. 1a) を認め、発症を確認した。尾部を持って逆さにすると、正常マウスの後肢は開脚、伸展する (Fig. 1b)。同時に全例に腹膜炎を認めた。なお、0.1% チメロサールの

腹腔内投与 19 回後に 1 匹事故死している。0.01% チメロサール腹腔内投与 $7 \mu\text{gHg/g}$ で既に腎臓および脾臓に陽性反応があり、神経系および肝臓にもわずかな陽性反応を認めた。しかしながら、14 $\mu\text{gHg/g}$ でも同程度の反応であり、腹膜炎は認めなかった。0.01% チメロサール皮下投与でもほぼ

Fig. 1a. Crossing and flexion of hind legs (A-IP-2, 100 μ Hg/g). Fig. 1b. Control mouse.

Table 3. The Value of Total and Inorganic Mercury in the Organs of Experimental Mice (μ g/g)

Group & Route	Dose μ g Hg/g	Brain		Liver		Kidney		Spleen		Heart		Lung		Skin	
		T-Hg	I-Hg	T-Hg	I-Hg	T-Hg	I-Hg	T-Hg	I-Hg	T-Hg	I-Hg	T-Hg	I-Hg	T-Hg	I-Hg
A-IP-1	70	23.98	8.03	90.13	49.35	48.90	15.24	23.88	6.30	23.29	8.42	18.08	2.42	nd	nd
A-IP-2	100	19.08	8.44	65.66	25.38	40.44	14.56	nd	nd	29.89	13.24	15.78	2.59	nd	nd
A-IP-3	140	9.30	6.72	12.89	5.34	22.73	12.16	12.17	6.37	12.26	6.96	7.89	2.62	nd	nd
A-IP-4	140	11.83	9.33	16.13	6.15	20.59	10.38	12.09	6.66	11.91	7.33	8.71	2.97	nd	nd
A-IP-5	(78)	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
A-SC-1	140	10.18	5.32	17.26	5.18	22.06	10.42	9.82	3.83	10.78	3.09	12.75	2.25	24.06	8.92
A-SC-2	140	9.67	5.60	24.89	8.62	27.57	13.48	12.98	5.65	14.53	5.49	10.88	2.23	21.33	5.61
A-SC-3	140	12.24	6.43	19.69	6.89	25.61	10.68	12.67	6.32	20.05	6.03	15.55	3.42	24.93	4.96
A-SH-4	140	11.48	6.46	26.11	8.83	21.51	12.55	15.50	6.83	21.64	7.95	7.37	1.28	21.86	6.86
A-SC-5	140	10.49	5.80	23.01	9.11	24.26	13.37	12.16	4.42	13.34	4.76	12.64	1.87	18.85	4.08
B-IP-1	7	0.63	0.32	5.61	2.35	7.04	3.65	1.31	0.35	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B-IP-2	10	0.60	0.35	5.36	2.05	8.54	3.73	1.51	0.31	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B-IP-3	14	0.28	0.20	2.20	1.49	2.63	2.13	0.53	0.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B-IP-4	14	0.32	0.24	1.79	1.14	2.61	2.14	0.47	0.22	nd	nd	nd	nd	nd	nd
L-SC-1	14	0.38	0.24	1.71	1.07	3.07	2.54	0.54	0.21	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B-SC-2	14	0.40	0.24	1.96	1.08	2.70	2.06	0.55	0.31	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B-SC-3	14	0.43	0.29	2.18	1.35	3.16	2.53	0.65	0.30	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B-SC-4	14	0.39	0.24	2.11	1.42	3.38	2.50	0.57	0.26	nd	nd	nd	nd	nd	nd
B-SC-5	14	0.44	0.25	2.35	1.56	3.07	2.35	0.56	0.25	nd	nd	nd	nd	nd	nd

T-Hg: Total mercury I-Hg: Inorganic mercury nd: not done

Table 4. The Ratio of Inorganic Mercury to Total Mercury in Organs of Experimental Mice (%)

Organ	Dose Route	140 μg Hg/g		140 μg Hg/g	
		IP (n=2)	SC (n=5)	IP (n=3)	SC (n=5)
Brain		75.6 $\pm$ 4.7	54.9 $\pm$ 2.4	75.1 $\pm$ 3.7	61.8 $\pm$ 3.9
Liver		39.8 $\pm$ 2.3	34.6 $\pm$ 3.4	65.2 $\pm$ 2.2	62.7 $\pm$ 4.8
Kidney		52.0 $\pm$ 2.2	50.3 $\pm$ 6.6	80.3 $\pm$ 2.1	77.9 $\pm$ 3.5
Spleen		53.7 $\pm$ 1.9	40.2 $\pm$ 3.4	53.6 $\pm$ 5.9	46.3 $\pm$ 6.3
Heart		59.2 $\pm$ 3.4	33.8 $\pm$ 4.1	nd	nd
Lung		33.7 $\pm$ 0.6	18.5 $\pm$ 2.8	nd	nd
Skin		nd	27.3 $\pm$ 7.1	nd	nd

IP: Intraperitoneal SC: Subcutaneous nd: not done

Table 5. The Degradation of Methyl Mercury, Ethyl Mercury, and Thimerosal into Inorganic Mercury by the Reactive Oxygen Producing Systems

Reaction system	n	Inorganic mercury (ng) produced from organic mercury (800 ng Hg)		
		Methyl mercury	Ethyl mercury	Thimerosal
MPO-H ₂ O ₂ -Cl ⁻	4	24.0 $\pm$ 2.4	208.8 $\pm$ 25.6	193.2 $\pm$ 6.8
XOD-HPX-Fe (III) EDTA	4	38.8 $\pm$ 4.8	101.6 $\pm$ 7.2	86.8 $\pm$ 3.2
Neutrophil stimulated by PMA	5	1.4 $\pm$ 0.9	29.4 $\pm$ 1.7	28.0 $\pm$ 5.4
Macrophage stimulated by PMA	5	0.2 $\pm$ 0.2	19.4 $\pm$ 3.4	18.9 $\pm$ 3.2

MPO: Myeloperoxidase

XOD: Xanthine oxidase

HPX: Hypoxanthine

EDTA: Ethylenediaminetetracetic acid PMA: Phorbol myristate acetate

MPO-H₂O₂-Cl⁻ system: 50 mM phosphate-150 mM NaCl buffer, pH 6.2, 200 ng Hg/ml organic Hg, 100 mV/ml MPO, 50 μM H₂O₂ (30°C, 30 min)XOD-HPX-Fe (III) EDTA system: 50 mM phosphate buffer, pH 7.4, 200 ng Hg/ml organic Hg, 2 μM N-acetyl-L-cystein, 0.2 mM HPX, 10 mV/ml XOD, 2 μM Fe (III) EDTA (30°C, 60 min)

Neutrophil and macrophage system: 10 cells/ml rat peritoneal neutrophils (or macrophages), 200 ng Hg/ml organic Hg, 10 ng/ml PMA, Eagle-MEM (37°C, 2 hr).

同様の結果を得た。ただし、1例の注射局所の皮下にわずかな陽性所見を認めた(**Table 2**)。また、対照群は全て陰性であった。

3. マウス臓器中の水銀値

さらに、実験に供したマウス臓器中の総水銀値と無機水銀値を測定した(**Table 3**)。測定した水銀値は無機水銀値で全て 0.2 $\mu\text{g/g}$ 以上であり、水銀組織化学反応は陽性であった。各臓器の無機水銀値の占める割合は **Table 4** に示すように腹腔内投与の方がいずれも高い値を示した。

生化学的手法による活性酸素産生系 (MPO-H₂O₂-Cl⁻系, XOD-HPX-Fe(III)EDTA系)及び食細胞(好中球, マクロファージ)によるチメロサールの分解をメチル水銀, エチル水銀のそれと比較

した(**Table 5**)。これらの系のメチル水銀, エチル水銀の分解能については既に報告した¹⁴⁻¹⁷。チメロサルは生化学的手法による活性化好中球および活性化マクロファージによる活性酸素産生系によりともに分解され、その被分解性はエチル水銀と同程度であり、メチル水銀より分解されやすい事が分かった。

考 察

R₁-Hg-S-R₂ タイプの水銀化合物は殺菌作用があり、中でもチメロサルは低濃度で優れた殺菌力を示し、且つ毒性が低いので 1931 年から Merthiolate の商品名で生物製剤等の防腐剤として使

用されている。Powell et al.¹⁸ は 22 人の被験者に 1% チメロサル水溶液を 1 回当たり最大 50 ml, 中には 5 回に分けて 180 ml も静脈投与したが, アナフィラキシーショック症状を呈する者はいなかったと報告している。以来, チメロサルは非常に安全性の高い防腐剤として種々の生物製剤に添加されてきた。また, FDA の Kirschstein¹⁹ は, 生物製剤の防腐剤についてマウス, ラットを用いて毒性及び発癌性を調べたが, チメロサルを含めて, 調べた全ての試薬に発癌性は認められなかったと述べている。

しかしながら, 白木²⁰ はチメロサル 0.01% 含有の人血漿を 1 回 200~400 ml ずつ, 23 回, 29 日間にわたりほぼ連続して合計 8,000 ml (エチル水銀化合物とし約 800 mg) 静注された 13 歳, 男のエチル水銀中毒症の 1 剖検例を報告している。報告によると, 蛋白喪失性胃腸症としてキノホルムを投与され, SMON を合併していた。両手指先端の知覚異常, 全身搔痒感, 口唇のしびれ, 手掌のしびれ, 食欲不振, 傾眠性, 言語障害, 両手の不随運動, 企図振戦, 胸内苦悶, 全身倦怠, 嘔気頻繁, 興奮状態, 四肢完全麻痺, 発汗, 喘鳴, 唾液分泌過剰, 昏睡状, 呼吸困難などの症状を呈して, 発症後 9 日で死亡した。総水銀値は毛髪で 9.3~186.7 $\mu\text{g/g}$, 肝臓 43.3 $\mu\text{g/g}$, 腎臓 12.5~21.1 $\mu\text{g/g}$, 脳灰白質 17.0 $\mu\text{g/g}$, 脳白質 20.8 $\mu\text{g/g}$ であった。総水銀値に対する無機水銀値の割合は尿 43.6%, 血漿 20.3%, 赤血球 12.3%, 肝臓, 腎臓が 11.5~18.8% で無機水銀が比較的高い値を示した。現在チメロサルは筋注用ヒト免疫グロブリン製剤に使用されているが, 静注用には使用されていないので大量投与の危険性はない。

チメロサルを皮内接種すると遅延型アレルギー反応を呈することがある²¹⁻²⁵。このアレルギー反応は若年者に多発する傾向があり, スウェーデンの Möller²⁶ は, 約 15~25% に達すると述べている。そのため, ツベルクリンのようにチメロサルを防腐剤として用いると疑似反応を呈する危険性がある²⁷⁻²⁹。また, ソフトコンタクトレンズの保存液にチメロサルが含まれているために, 眼球結膜にアレルギー反応を起こすとの報告もある³⁰⁻³²。さらに, 0.01% チメロサル含有および不含有百日咳ワクチンをマウスの腹腔内に接種

して, 体重減少および致死活性を調べたところ, チメロサル含有ワクチンの方が強い毒性を示した³³。また, チメロサル含有百日咳ワクチンをマウス腹腔内に接種すると少数のマウスに腸重積症が観察された³⁴。一方, チメロサル不含有百日咳ワクチンの力価はチメロサル含有ワクチンより不安定であったと言う報告もある³⁵。

本実験は, チメロサルの頻回投与における水銀の蓄積と病変の有無を調べたものである。発症例の脳および小脳には光顕的には水銀沈着以外に神経細胞の脱落や減数は認めていない。なお, 水銀組織化学反応で陽性を示す水銀は無機型であり, その検出限界は 0.2 $\mu\text{g/g}$ である³⁶。0.1% チメロサルを腹腔内に投与すると腹膜炎をおこすが, 0.01% チメロサルの頻回投与にもかかわらずそれらは見られなかった。0.01% チメロサルの皮下投与でも蓄積量が 7 $\mu\text{g Hg/g}$ ~14 $\mu\text{g Hg/g}$ になれば, 腎臓には陽性所見があり, 神経系, 肝臓および脾臓にもわずかの陽性所見が得られる事が分かった。0.01% のチメロサルの皮下投与実験は週 2 回接種で連続 8 週間投与した結果であり, 人体のワクチン接種量に比べると極めて多量であるが, チメロサルの安全性を検討するひとつのモデル実験として行ったものである。

エチル水銀中毒とメチル水銀中毒の神経病理学は, Takeuchi⁶ の動物実験によればほとんど相違がないことが分かっている。マウスでメチル水銀中毒症と同様に, 後肢屈曲交差現象が見られたことから, 末梢神経病変を検索中であり, チメロサルの水銀蓄積による安全性については, その結果を待たねばならない。

本実験で得られたもう 1 つの知見は, チメロサル投与マウスでは水銀の無機化がメチル水銀よりも速いという成績である。各臓器の無機水銀値の占める割合を検討したが, マウス体内のチメロサルの分解はメチル水銀に比べて速くエチル水銀と同程度と予想される (Table 4)。Magos³⁷ はラットの脳, 肝臓及び腎臓に蓄積する水銀のうち無機水銀の占める割合はエチル水銀投与例の方がメチル水銀投与例よりも高いことを報告している。また, Suda¹⁷ も同様の結果を得ている。さらに各種活性酸素産生系によるチメロサルの分解はエチル水銀と同程度であり, メチル水銀より

も分解され易かった(**Table 5**)。また、チメロサールの腹腔内投与で好中球及びマクロファージの浸潤を招来するため、これらの細胞がチメロサールの分解に関与している可能性がある。PMAで刺激した好中球およびマクロファージがチメロサール分解能を持つという結果(**Table 5**)、また、エチル水銀投与ラット血中の食細胞がメチル水銀投与ラットの場合に比べて、より高い無機水銀値を保有していたと言う成績¹⁷はこの推察を裏付けている。しかし生体内での無機化には食細胞だけではなく、肝臓のミクロソーム等も関与すること³⁸が知られているので、これらの細胞は無機化のすべてに関与しているのではなく、有機水銀の無機化の一部に過ぎないと考えられた。

謝辞：本研究にあたり御助言を得た国立予防衛生研究所安全性研究部長茅野文利博士、ワシントン大学医学部神経病理学教授 Cheng-Mei Shaw 博士に謝意を表します。また、本研究は平成元年度環境庁公害防止等調査研究委託費の支援を受けました。記して感謝致します。

文 献

- Hunter, D and Russell, ES: Focal cerebral and cerebellar atrophy in a man subject due to organic mercury compound. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* **17**: 235, 1954.
- Pentschew, A: Quecksilbervergiftung. *In: Handbuch der spez. Path. Anat. Histolog. Erkrankungen des zentralen Nervensystems. II*, Springer-Verlag, Berlin, 1958.
- Takeuchi, T, Kambara, T, Morikawa, N, Matsumoto, H, and Murao, M: Pathological studies on encephalopathia from unknown cause in Minamata district of Kumamoto prefecture (so-called Minamata disease) in Japan. *Acta Pathol Jpn* **7** (Suppl.): 607-611, 1958.
- Takeuchi, T, Kambara, T, Morikawa, N, Matsumoto, H, Shiraishi, Y, and Ito, H: pathologic observations of the Minamata disease. *Acta Pathol Jpn* **9** (Suppl.): 769-783, 1959.
- Takeuchi, T: Experiments with organic mercury, particularly with methyl-mercury compounds; Similarity between experimental poisoning and Minamata disease. *In: Minamata Disease. Study group of Minamata Disease, Kumamoto University (Japan)*: 229-252, 1968.
- Takeuchi, T: Biological reactions and pathological changes in human beings and animals caused by organic mercury contamination. *In: Environmental Mercury Contamination*, R Hartung, and BD Dinman, Eds., Ann Arbor Sci. Publ. I.N.C., Michigan, 1972.
- Takeuchi, T and Eto, K: Minamata disease; Chronic occurrence from pathological view points. *In: Studies on the Health Effects of Alkylmercury in Japan, 1975: Environment Agency, Japan, 1975.*
- Takeuchi, T and Eto, K: Pathology and pathogenesis of Minamata disease. *In: Minamata disease, Methylmercury poisoning in Minamata and Niigata, Japan, T Tsubaki, and K Irukayama, Eds., Kodansha Ltd., Tokyo, Elsevier Sci., Amsterdam, Oxford, New York, 1977.*
- Eto, K and Takeuchi, T: A pathological study of prolonged cases of Minamata disease. With particular reference to 83 autopsy cases. *Acta Pathol Jpn* **28**: 565-584, 1978.
- Okabe, M and Takeuchi, T: Distribution and fate of mercury in tissues of human organs in Minamata disease. *Neurotoxicology* **1**: 607-624, 1980.
- Tokunaga, H, Furusawa, R, and Eto, K: The differentiation of mercury granules from pigments present in the internal human organs by photo-emulsion method (in Japanese). *Pathol Clin Med* **6**: 845-848, 1988.
- Suda, I and Takahashi, H: Enhanced and inhibited biotransformation of methyl mercury in the rat spleen. *Toxicol Appl Pharmacol* **82**: 45-52, 1986.
- Konishi, T and Takahashi, H: Direct determination of inorganic mercury in biological materials after alkali digestion and amalgamation. *Analyst* **108**: 827-834, 1983.
- Suda, I and Takahashi, H: Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by other reactive oxygen species besides hydroxyl radical. *Arch Toxicol* **66**: 34-39, 1992.
- Suda, I, Totoki, S, and Takahashi, H: Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by oxygen free radical-producing systems; involvement of hydroxyl radical. *Arch Toxicol* **65**: 129-134, 1991.
- Suda, I, Totoki, S, Uchida, T, and Takahashi, H: Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by various phagocytic cells. *Arch Toxicol* **66**: 40-44, 1992.
- Suda, I, Suda, M, and Hirayama, K: Phagocytic cells as a contributor to in vivo degradation of alkyl mercury. *Bull Environ Contam Toxicol* (in press), 1993.
- Powell, HM and Jamieson, WA: Merthiolate as a germicide. *Am J Hyg* **13**: 296-310, 1931.
- Kirschstein, RL: Toxicology and carcinogenicity of preservatives used in the preparation of biological products. *Dev Biol Stand* **24**: 203-212, 1974.
- Shiraki, H: An autopsy case study of ethylmercury poisoning at florid stage with special reference to neuropathological aspect (in Japanese). *In: A comprehensive research of Minamata disease, 1975.*
- Förström, L, Hannuksela, M, Kousa, M, and Lehmuskallio, E: Merthiolate hypersensitivity and vaccination. *Contact Dermatitis* **6**: 241-245, 1980.
- Jacobs, LtCRL, Lowe, RS, and Lanier, BQ: Adverse reactions to tetanus toxoid. *JAMA* **247**:

- 40-42, 1982.
23. Cox, NH and Forsyth, A : Thimerosal allergy and vaccination reactions. *Contact Dermatitis* **18** : 229-233, 1988.
 24. Rietschel, RL and Adams, RM : Reactions to thimerosal in hepatitis B vaccines. *Dermatol Clin* **8** : 161-164, 1990.
 25. Osawa, J, Kitamura, K, Ikezawa, Z, and Nakajima, H : A probable role for vaccines containing thimerosal in thimerosal hypersensitivity. *Contact Dermatitis* **24** : 178-182, 1991.
 26. Möller, H : Sensitizing aspects of preservatives in man. *Dev Biol Stand* **24** : 197-202, 1974.
 27. Hansson, H and Möller, H : Intracutaneous test reactions to tuberculin containing merthiolate as a preservative. *Scand J Infect Dis* **3** : 169-172, 1971.
 28. Magnusson, B and Möller, H : The adjuvant effect of tuberculin in experimental sensitization to merthiolate. *Arch Derm Res* **258** : 235-239, 1977.
 29. Möller, H : Merthiolate allergy : A nationwide iatrogenic sensitization. *Acta Dermatovener Stockholm* **57** : 509-517, 1977.
 30. Gordon, A : Prospective screening for thimerosal hypersensitivity : A pilot study. *Am J Optometry Physiol Optics* **65**(3) : 147-150, 1988.
 31. Tosti, A and Tosti, G : Thimerosal : a hidden allergen in ophthalmology. *Contact Dermatitis* **18** : 268-273, 1988.
 32. Tosti, A, Guerra, L, and Bardazzi, F : Hyposensitizing therapy with standard antigenic extracts : an important source of thimerosal sensitization. *Contact Dermatitis* **20** : 173-176, 1989.
 33. Nelson, EA and Gottshall, RY : Enhanced toxicity for mice of pertussis vaccines when preserved with merthiolate. *Appl Microbiol* **15** : 590-593, 1967.
 34. Blaskett, AC, Walden, NB et al. : Thimerosal preservative, pertussis vaccine and intussusceptions of the bowel in mice. *J Biol Stand* **6** : 267-270, 1978.
 35. Gardner, RA and Pittman, M : Relative stability of pertussis vaccine preserved with merthiolate, benzethonium chloride, or the parabens. *Appl Microbiol* **13** : 564-569, 1965.
 36. Suda, I, Eto, K, Tokunaga, H, Furusawa, R, Suetomi, K, and Takahashi, H : Different histochemical findings in the brain produced by mercuric chloride and methyl mercury chloride in rats. *Neurotoxicology* **10** : 113-126, 1989.
 37. Magos, L, Brown, AW, Sparrow, S, Bailey, E, Snowden, RT, and Skipp, WR : The comparative toxicology of ethyl- and methylmercury. *Arch Toxicol* **57** : 260-267, 1985.
 38. Suda, I and Hirayama, K : Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by hydroxyl radical produced from rat liver microsomes. *Arch Toxicol* **66** : 398-402, 1992.