

臭化メチルの神経毒性 — 神経病理学的評価 —

— 予備的実験 —

古田 晶子¹, 百道 敏久², 大西 晃生³, 保利 一², 田中 勇武²

¹産業医科大学第一病理学教室

²産業医科大学産業生態科学研究所 労働衛生工学教室

³産業医科大学神経内科学教室

要 旨: 臭化メチルはヒトに中枢および末梢神経障害を惹起する。現在までの臭化メチル中毒動物の神経病理学的な研究にもかかわらず、臭化メチル中毒による多彩なヒトの神経障害は実験動物で十分に再現されていない。本研究では、1日6時間、週3日、3-8週間にわたり、500または290 ppmの臭化メチルの繰り返し曝露を受けたラットの神経系病変を組織形態学的に系統的に検索し、未だ実験動物で再現されていない病変を明らかにすることを目的とした。その結果、10-18日間の500 ppmの臭化メチル曝露によってのみ、ヒトの脊髄後索病変に対応すると判断される頸髄薄束有髄線維の軸索変性およびヒトの大脳病変に対応すると判断される、1) 尾状核-被殻の壊死病変、2) 尾状核-被殻、視床および帯状皮質の神経細胞の萎縮およびニューロビルの染色性の低下が認められた。この実験により初めて明らかになった脊髄後索病変の作成は、繰り返し曝露が可能でかつ500 ppm以上の濃度の臭化メチルの曝露によって達成されると推定される。

(1992年10月7日 受付, 1993年1月5日 受理)

は じ め に

臭化メチルは、ヒトに中枢神経障害などを惹起する毒性の強いガスであるが、安価で殺虫作用が強く燻蒸剤として広く利用されていることから、今後も穀類、木材、土壌などの燻蒸剤として用いられると考えられる [1]。通常臭化メチル中毒の神経症状は急性中毒患者で認められる。臭化メチル中毒患者においては、臨床的に意識障害、全身けいれん発作、失調性歩行・構音障害・眼振などの小脳症状、錐体路症状、視力・視野障害、末梢神経障害などが生じることが明らかにされているが、各臨床症候の責任病変および病変の性質については臨床病理学的に不明な点も少なくない [2]。

一方、実験的な臭化メチル中毒動物においては、大脳皮質、小脳皮質および顆粒細胞層、尾状核-被殻などの大脳基底核、視床、内側膝状体、黒質などの異常が明らかにされている [3-7]。しかしながら、実験動物における病変が臭化メチル中毒患者の病変および

臨床症候とどのように対比しうるかは、十分に明らかにされていない。その理由の一つとして、臭化メチル中毒による多彩なヒトの神経障害は実験動物で十分に再現されていないことが挙げられる。

本報告では、臭化メチルの繰り返し曝露により生じるラットの神経系病変を組織形態学的に系統的に検索し、従来指摘されていた大脳病変に加え、文献上記載されていなかった脊髄後索病変を明らかにしたので報告する。

材 料 と 方 法

実験1: 体重約310 gmの雄性Wistarラット14匹(実験群)を、1日6時間、週3日間、合計10-18日間(60-108時間)、500 ppmの臭化メチルに曝露した。他の同性、同週齢のラット8匹(対照群)を、実験群と同様の条件下で室内空気に曝露させた [8]。実験群と対照群の間でpair-feedingを行った。10日間の曝露完了9日後に各群ラット4匹ずつを

3% グルタルアルデヒド溶液 (0.05M カコジル酸ソーダ緩衝液, pH 7.40) で灌流固定した。その後各ラットにおいて同様に, 足関節部の遠位部腓腹神経ならびに大腿遠位部の腓骨神経を採取し, ときほぐし線維標本およびエボン包埋標本を作製した [9]。ときほぐし線維標本については異常ときほぐし線維の頻度を算出した [10]。エボン包埋標本についてはトルイジンブルー染色後, 光学顕微鏡で観察した。同時に第5腰髄後根神経節, 第3頸髄および第5胸髄薄束および延髄薄束核を採取しエボン包埋標本を作製した。他の実験群ラット6匹について, 10日間の曝露完了7日後に2匹を, 11, 12, 14 および18日間の曝露完了後それぞれの翌日に各々1匹を, また他の対照群ラット4匹を18日間曝露を受けた実験群ラットと同一日に4%パラフォルムアルデヒド溶液 (0.05M 磷酸緩衝液, pH 7.40) で灌流固定した。その後, 各ラットにおいて同様に第5腰髄, 第6胸髄, 第6頸髄, 延髄, 橋, 中脳, 小脳虫部, 小脳半球部のパラフィン包埋標本ならびに視床, 線条体および淡蒼球のレベルの冠状断大脳パラフィン包埋標本を作製した。各標本の切片に hematoxylin & eosin, klüver-Barrera および Bodian 染色を行い光学顕微鏡で観察した。

実験2: 体重約370 gmの雄性 Wistar ラット4匹 (実験群) を, 1日6時間, 週3日間, 合計24日間 (144時間), 290 ppm の臭化メチルに曝露した [8]。他の同性, 同週齢のラット4匹 (対照群) を実験群と同様の条件下で室内空気に曝露させた。実験群と対照群の間で pair-feeding を行った。曝露完了7日後に, 各群ラット2匹ずつを3%グルタルアルデヒド溶液 (0.05M カコジル酸ソーダ緩衝液, pH 7.40) および4%パラフォルムアルデヒド溶液 (0.05M 磷酸緩衝液, pH 7.40) で灌流固定し, 末梢神経のときほぐし線維標本を除き, 他の標本について実験1と同様の観察を行った。

結 果

一般観察所見

実験1において, 10日間の曝露までに4匹が死亡した。10-18日間の曝露終了後組織学的な検索までの経過観察中に持続的に, 実験群ラット10匹中1匹が軽度の後肢の動揺性歩行を, 他の2匹が軽度の不器用な後肢の動きを示した。対照群ラットには同様の

所見は認められなかった。実験2においてはいずれの時期にも両群ラット間に持続的に認められる歩行, 後肢の動きの差は認められなかった。

体重の変化: 実験1では, 実験群および対照群両群ともに体重の低下を示したが, 全実験期間を通じて両群間の体重に明らかな差は認められなかった。実験2では, 実験および対照両群ともに体重増加を示したが, 全実験期間を通じて両群間の体重に差は認められなかった。

組織学的所見

1) ときほぐし線維所見

実験1: 実験群において, 腓腹および腓骨両神経で軸索変性を示すときほぐし線維の頻度は, 0-2%であったが, 対照群において, その頻度は0%であった。節性脱髄所見は認められなかった。

2) 末梢神経, 脊髄後根神経節, 脊髄神経根のエボン包埋標本の所見

実験1, 2のいずれにおいても実験・対照両群間の組織学的所見に明らかな差は認められなかった。

3) 第5胸髄および第3頸髄薄束のエボン包埋標本の所見

実験1: 実験群4匹中3匹において, 第3頸髄薄束に, 髓球出現が認められた (Fig. 1)。第5胸髄薄束ではごく少数の髓球出現が4匹中3匹で認められた。対照群においては第5胸髄および第3頸髄薄束のいずれにおいても髓球の出現は認められなかった。

実験2: 実験1で認められたような髓球出現は実験群に認められず, 対照群との間で組織学的所見に明らかな差は認められなかった。

4) 薄束核のエボン包埋標本の所見

実験1: 実験群では対照群よりも腫大軸索が高頻度で認められた。低頻度の髓球出現が実験群で認められたが, 対照群では認められなかった。

実験2: 実験および対照両群に腫大軸索が低頻度で認められた。実験1で認められたような髓球出現は実験群に認められなかった。

5) 大脳, 脳幹および小脳のパラフィン包埋標本の所見

実験1: 10回以上の曝露を受けたラット5匹のすべてに以下のような異常所見のいずれかが認められた。

5匹中3匹の尾状核-被殻の中央部に限局して, ①大食細胞の遊走を伴い周辺にグリア組織の増生を認める左右対称性の境界不鮮明な壊死巣, ②神経細胞の萎

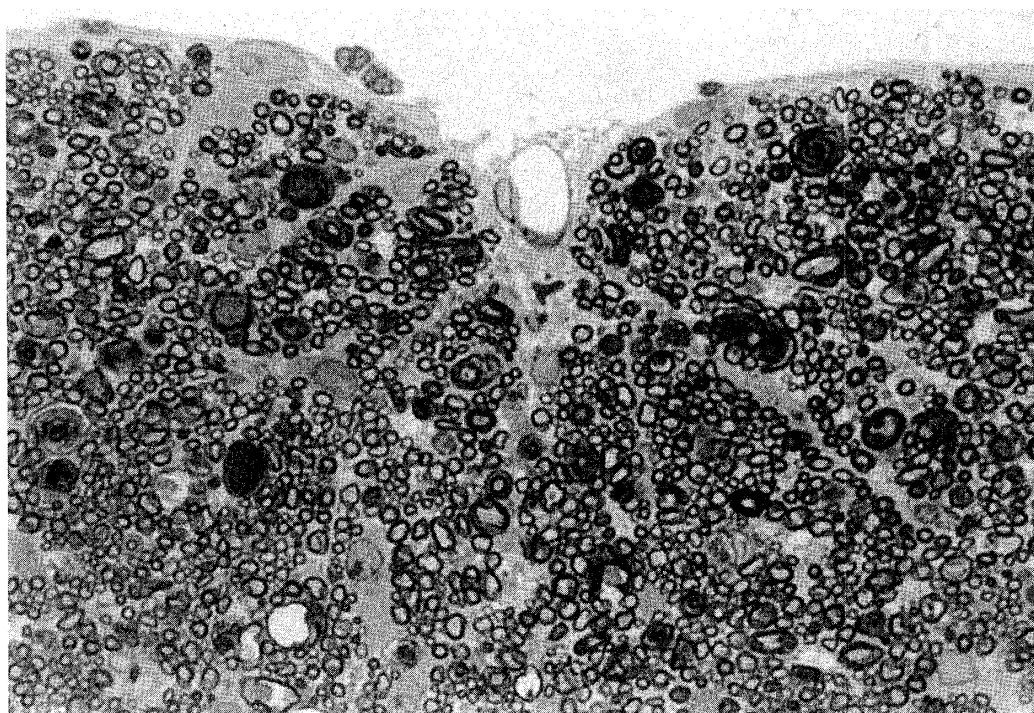


Fig. 1. Transverse section of the dorsal portion of the gracile fascicle at the 3rd cervical spinal cord. Myelin ovoids are frequently observed. Epon-embedded section stained with toluidine blue, $\times 700$

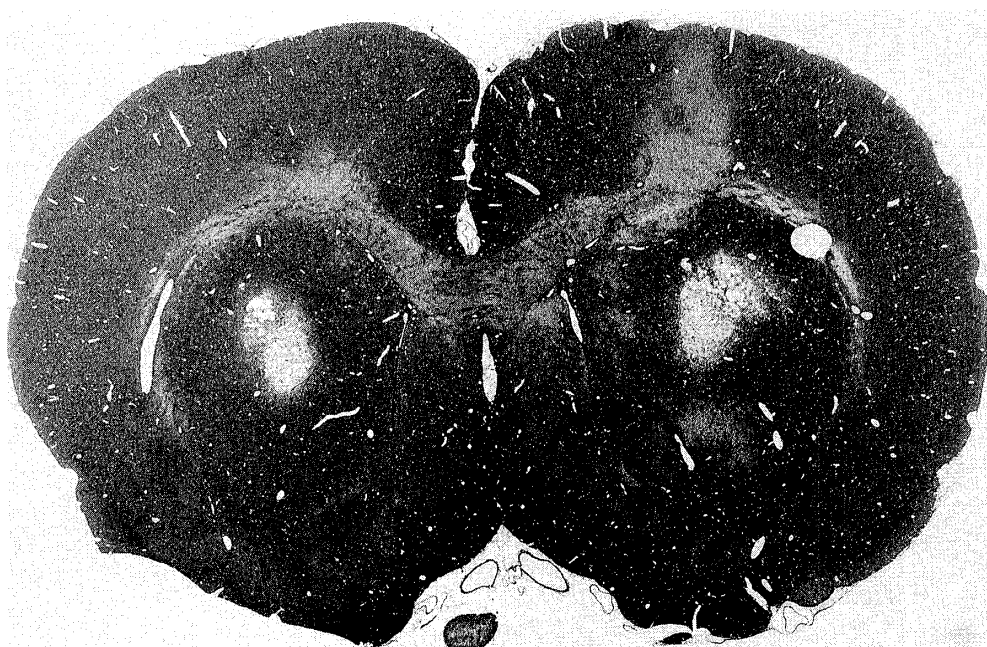


Fig. 2. Coronal section of the cerebrum. Necrotic lesions are observed bilaterally in the caudate-putamen. H & E staining, $\times 10$

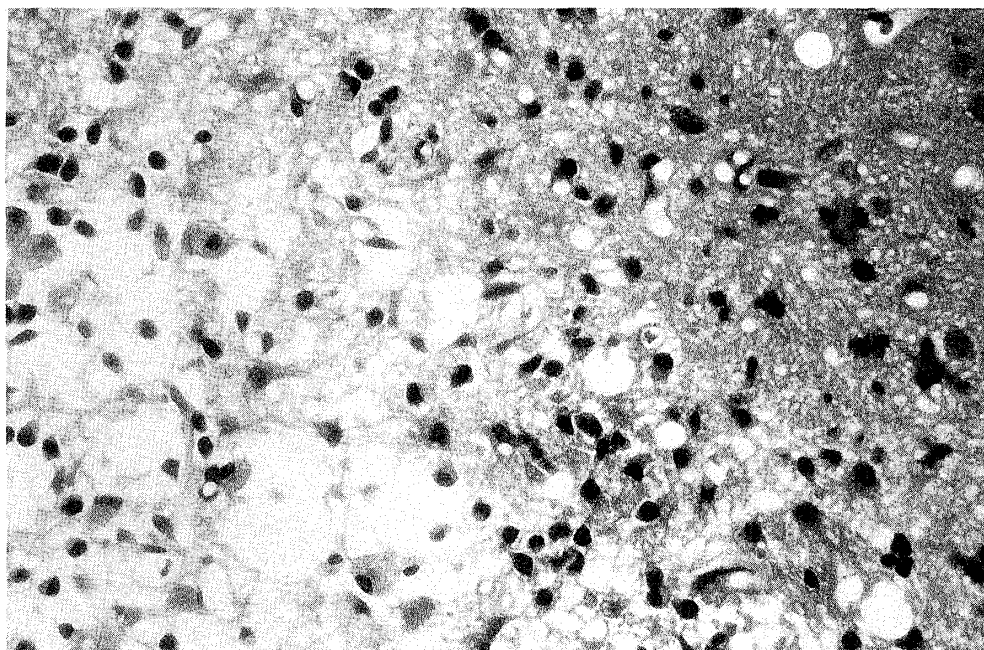


Fig. 3. Necrotic area with shrunken neurons, macrophage infiltration and reactive astrocytosis on the left and relatively well preserved neuropile with reactive astrocytosis surrounding the necrotic area on the right. High power view of a part of the necrotic area shown in Fig. 2. H & E staining, $\times 450$

縮およびニューロピルの染色性の低下を示し、その境界が比較的鮮明な左右対称性の病巣、③毛細血管の増殖を伴いその境界が不鮮明な左右対称性の病巣が認められた (Fig. 2, 3).

5 匹中 4 匹の視床に、①神経細胞の萎縮およびニューロピルの染色性の低下を示し、その境界が鮮明な左右対称性の円形ないし butterfly 様の不完全壊死巣、②軽度のグリア組織の増生を伴った神経細胞の萎縮を示し、その境界が不鮮明な左右対称性の円形の限局性のグリオーシスが認められた。

尾状核-被殻の断面における大脳皮質では 5 匹中 2 匹で、帯状皮質 1, 2 にわたって、神経細胞の萎縮およびニューロピルの染色性の低下を示し、左右対称性でその境界が比較的鮮明な病巣を認めた。他の部位には上記のような明らかな異常所見は認められなかった。

実験 2：いずれの実験群ラットにおいても、対照群ラットに比較して実験 1 で認められたような明らかな異常所見は認められなかった。

考 察

臭化メチル中毒による多彩なヒトの神経障害は実験動物で十分に再現されていない。本実験では文献の記

載を検討し、神経障害が惹起されやすいと考えられる比較的大量曝露 (500 または 290 ppm) を繰り返した。その結果、500 ppm の臭化メチルの 10 回以上の繰り返し曝露により病理形態学的に确实と考えられる病変が認められた。尾状核-被殻、視床および帯状皮質の病変は、同一病変であるが、①最も障害が軽度と考えられるグリア増生を伴う血管増殖、②障害が中等度と考えられるニューロピルの染色性低下と神経細胞の萎縮、③障害が高度と考えられる壊死、に形態学的観点から分類可能であろうと推定された。この 3 つの病変は、それぞれの部位における病変発生後から観察までの時間経過の差異、脳の部位特異性などをも反映していると考えられる。この病態の直接の発生要因は不明であるが、臭化メチルの直接作用およびそれに伴う脳局所の代謝障害が病態の発生に重要と考えられる [11]。さらに急性期に生じる可能性が推定される脳虚血または低酸素症も病態の発生に関与すると推定される。なおこの 3 つの病変は、ネコ、ラットを用いた実験で文献上記載されている病変と同一性質のものと推定される [4, 5, 7] が、本研究結果のようにその病変を分類する試みは今まで行われていない。しかし、これらの病変は臭化メチル中毒患者の意識障害、けいれん発作、不随意運動、錐体路・錐体外路症状な

どの責任病変 [2, 12] と十分に対応するものではない。

一方、頸髄薄束および延髄薄束核で認められた病変は、脊髄後索を上行する第一次感覚ニューロンの中枢性軸索突起の変性に対応すると判断される [13]。それ故、臭化メチル曝露によって、他の中毒性ニューロパチーでも障害されやすい大型の第一次感覚ニューロンの中枢性軸索突起の遠位部が障害されたものと判断した [13]。その障害の程度は比較的軽いが、この障害は臭化メチル中毒患者にみられる脊髄後索病変に対応すると考えられる [2, 14, 15]。また本研究では、結果で述べたように末梢神経のときほぐし線維所見およびエボン包埋標本の所見について両群間の差は明らかでなかったが、文献上、慢性臭化メチル患者でみられる末梢神経障害 [16, 17] も上記の第一次感覚ニューロンの障害に関連して生じていると推定される。臭化メチル中毒動物において、この頸髄薄束の病変は文献上明らかにされていないが、その理由として、上部頸髄の検索が十分行われなかったこと、通常用いられるパラフィン標本では個々の有髄線維の変性の有無を詳細に捉えることが極めて困難であることなどが考えられる。

本研究ではグルタルアルデヒド固定組織において延髄、脊髄および末梢神経系の検索を行い、パラフォルムアルデヒド固定組織において大脳、小脳、脳幹の検

索を行ったので、同一個体における頸髄病変と尾状核—被殻、視床および帯状皮質の大脳病変との相関関係を論じることは出来ない。今後、この相関関係を検討することは病変の発生機序を理解するために重要であると考えられる。

この実験により初めて明らかにした脊髄後索病変は、繰り返し曝露が可能でかつ 500 ppm 以上の濃度の臭化メチルの曝露によって可能であると推定される。

本研究で小脳病変は認められなかったが、Hurtt らは、250 または 325 ppm の臭化メチル曝露により、小脳顆粒細胞層の変性所見を認めている [7]。Hurtt らの用いた Fischer 344 ラットと我々が用いた Wistar ラットでは病変分布が異なる可能性が推定され、その原因としてラットの系統の差が考えられる。

急性臭化メチル中毒患者に認められる神経症候を出来る限り忠実に実験動物に再現する研究では、その実験動物の神経系の組織病理学的研究結果と対比することを目的として、その動物の行動の変化の性質とその程度およびその時間的経過を検討することも重要である。

謝 辞

村井由之、橋本 洋両教授の御校閲を深謝する。

引 用 文 献

1. 波多野 章 (1989) : 第 2 章. 工業における利用状況. 臭化メチル中毒. 中毒発生の防止と管理. (石津澄子, 編). 日本くん蒸技術協会, pp 9-12
2. 井上尚英, 白石 悟, 村井由之 (1981) : 臭化メチル中毒. 日災害医誌 29: 891-898
3. Irish DD, Adams EM, Spencer HC *et al* (1940) : The response attending exposure of laboratory animals to vapors of methyl bromide. J Ind Hyg Toxicol 22: 218-230
4. 太田正気 (1960) : 実験的 Methylbromide 中毒に於ける中枢神経系の病理組織学的研究. 神戸医大紀要 20: 360-370
5. Kato N, Morinobu S & Ishizu S (1986): Subacute inhalation experiment for methyl bromide in rats. Ind Health 24: 87-103
6. 今宮俊一郎, 田中 茂, 高橋 謙, 他 (1982) : 臭化メチル曝露による健康障害の実態調査とその防止に関する実験的研究. 産業医学ジャーナル 5: 21-26
7. Hurtt ME, Morgan KT & Working PK (1987) : Histopathology of acute toxic response in selected tissues from rats exposed to inhalation to methyl bromide. Fundam Appl Toxicol 9: 352-365
8. Hori H, Hyakudo T & Tanaka I (1992) : A new methyl bromide gas generator for inhalation toxicity studies. J UOEH 14: 197-203
9. Dyck PJ (1975) : Pathologic alterations of peripheral nervous system of man. In: Peripheral Neuropathy. (Dyck PJ *et al*, ed). WB Saunders, Philadelphia pp 296-336

10. Dyck PJ, Stevens JC, Mulder DW *et al* (1975): Frequency of nerve fiber degeneration of peripheral motor and sensory neurons in amyotrophic lateral sclerosis: morphometry of deep and superficial peroneal nerves. *Neurology* 25: 781-785
 11. Alexeeff GV & Kilgore WW (1983): Methyl bromide. XVI. Mechanism of action. *In: Residue Reviews. Residues of pesticides and other contaminants in the total environment.* (Gunther FA & Gunther JD, *ed*). Vol 88, Springer-Verlag, New York, Heidelberg, Berlin pp 132-133
 12. 大澤美貴雄, 成瀬清子, 井上幸子, 他 (1979): 企図・動作性ミオクロームスを呈した臭化メチル中毒の1例. *神経内科* 10: 30-37
 13. Spencer PS & Schaumburg HH (1980): Chapter 7. Classification of neurotoxic disease: a morphological approach. *In: Experimental and Clinical Neurotoxicology.* (Spencer PS & Schaumburg HH, *ed*). Williams & Wilkins, Baltimore pp 92-99
 14. Carter AB (1945): Methyl bromide poisoning. Effects on the nervous system. *Brit Med J* 1: 43-45
 15. Araki S, Ushio K, Abe A *et al* (1971): Methyl bromide poisoning: A proposal for a new clinical classification and the results of its application to fifty-seven cases so far reported in Japan. *産業医学* 13: 419-425
 16. Kantarjian AD & Shaheen AS (1963): Methyl bromide poisoning with nervous with nervous system manifestations resembling polyneuropathy. *Neurology* 13: 1054-1058
 17. 山内俊雄, 諸治隆嗣, 高橋三郎 (1974): 主として知覚系の障害を呈したメチルブロマイド中毒の1症例について. *脳神経* 26: 1005-1011
-

Neurotoxicity of Methyl Bromide—Neuropathologic Evaluation — Preliminary Study —

Akiko FURUTA¹, Toshihisa HYAKUDO², Akio OHNISHI³, Hajime HORI¹ and Isamu TANAKA²

¹*Department of Pathology and Oncology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807, Japan*

²*Department of Environmental Health Engineering, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Yahatanishi-ku Kitakyushu 807, Japan*

³*Department of Neurology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Yahatanishi-ku, Kitakyushu 807, Japan*

Abstract : Methyl bromide exposure produces disorders of the central and peripheral nervous system. In the literature, there are many neuropathologic studies on the nervous system, especially on the central nervous system, of experimental animals intoxicated with methyl bromide presented. However, in our opinion, a variety of lesions of the nervous system described in the human methyl bromide intoxication have not been well reproduced in the experimental animals. In this study, male Wistar rats were subjected to a 6-hour exposure a day to methyl bromide at a concentration of 500 or 290 ppm 3 days a week for 3 to 8 weeks. The systematic neuropathologic studies of their central and peripheral nervous systems were carried out to reproduce the nervous system lesions in the human methyl bromide intoxication hitherto not produced in the experimental animals. Among the rats exposed to methyl bromide at a concentration of 500 ppm for 10 to 18 days, the axonal degeneration of myelinated fibers at the cervical level of the fasciculus gracilis, which probably corresponds to the degeneration of the spinal posterior column in humans, and the necrosis of the caudate-putamen and atrophy of neurons and pallor of the neuropile in caudate-putamen, thalamus and cingulate cortex, which probably correspond to the degenerative findings of the cerebrum in humans, were found. The rats exposed to methyl bromide at a concentration of 290 ppm for 8 weeks (24 days) did not show any noticeable abnormalities histologically. The results above suggest that the spinal cord lesion described for the first time is produced by the repeated exposure of rats to methyl bromide at a higher concentration than 500 ppm.

Key words : methyl bromide, neuropathology, animal model, necrosis, axonal degeneration.

J UOEH 15 (1): 21—27 (1993)