
 原 著

メチル水銀投与ラット組織および細胞画分への
水銀蓄積に対するキレート剤の作用効果

新潟大学医学部生化学第一教室 (指導: 高橋康夫教授)
新潟大学超遠心分析室

菅野イク

Effect of Chelating Agents on Accumulation and distribution of
Mercury in Tissues and Subcellular Fractions of
Methylmercuric Chloride Injected Rats

Iku SUGANO

*Department of Biochemistry, Niigata University School of Medicine,
and Laboratory of Ultracentrifugal Analysis, Niigata University
(Director: Prof. Yasuo TAKAHASHI)*

The effect of dimercaptosuccinic acid(DMSA), D-penicillamine(DPA), N-acetyl-D, L-homocysteine thiolactone(NAHCTL), and sodium selenite(Se) on the accumulation and distribution of mercury in tissues and subcellular fractions in methylmercuric chloride injected rats were studied. 1. Hg-lowering effect was in the order of DMSA>DPA>NAHCTL in liver and brain, and DMSA≒DPA>NAHCTL in kidney and blood. Se indicated the effect lower than DMSA and DPA in liver and kidney and the lowest in blood. Se caused remarkable increase(145%) in Hg value of brain as compared with control. 2. Hg-lowering effect on subcellular fractions was observed in a similar manner, DMSA>DPA>NAHCTL>Se. Se caused the increase in Hg values of subcellular fractions of brain except neuronal nuclei, nuclei of kidney, plasma, and stroma. Nucleoli of liver showed a tendency to resist reduction in Hg in common with four kinds of agents. 3. In cytosol of kidney the increase in the ratio of inorganic mercury was observed as a result of agent-dosing, suggestive of stimulation of biotransformation by administration of chelating agents. 4. From gel filtration of kidney cytosol the

Reprint requests to: Iku SUGANO,
Laboratory of SPINCO Ultracentrifuge,
Niigata University School of Medicine,
Niigata City, 951, JAPAN.

別刷請求先: 〒951 新潟市旭町通1番町
新潟大学医学部スピコン超遠心機室
菅野イク

following results were obtained; increase in the amount of protein-bound Hg localized to void volume resulting from Se-dosing; increase in inorganic mercury bound to metallothionein peak in NAHCTL-dosing which showed the highest ratio of inorganic mercury in cytosol; appearance of a new peak in low-molecular weight region in DMSA-dosing which was assumed as DMSA-Hg complex. 5. It is concluded that DMSA is most effective in reduction of Hg accumulation in tissues and its subcellular fractions in methylmercuric chloride injected rats and is most recommendable agent also from a view point of its low toxicity.

Key words: Methylmercury, chelating agent, Hg accumulation,
メチル水銀, キレート試薬, 水銀蓄積

はじめに

メチル水銀の神経毒性については、さまざまな面から研究がすすめられているが、毒性の本態、生体内でのメチル水銀化合物の動態および中毒症の治療などの分野においてははまだ未解決の問題を多数かかえている。

生体に投与されたメチル水銀は、赤血球および腎・肝・脳、その他の組織に分布蓄積する。これらの組織の細胞内ではメチル水銀は蛋白質に結合して比較的安定な複合体を形成しているが、一部はグルタチオンやシステインのような低分子と結合して存在する¹⁻³⁾。メチル水銀はこのような形で体内に永久に残留するのではなく、血流輸送や胆汁排泄などによる体内再分布、尿や糞による体外排泄、一部のメチル水銀の無機水銀への分解などによって多様な動態を示す⁴⁾。尿や糞による体外排泄あるいは毛髪への移行およびより排泄され易い無機水銀への変化は一見生体の解毒機構のようであるが、これを上まわる量のメチル水銀を生体が攝取しつづけた場合は神経毒性の発現を見ることになるであろう。メチル水銀中毒の治療、予防の観点からこれまで種々の SH 化合物投与による体内メチル水銀の排泄促進の研究が行われてきた⁵⁻¹⁹⁾。しかし単独の SH 化合物投与の研究例が多く、種々の SH 化合物の有効性の比較を行った研究は比較的少ない。本研究ではこれまでの研究で比較的高い有効性の報じられた3種の SH 化合物およびセレンを用いて実験を行ない、種々の組織におけるメチル水銀蓄積量の低減に対する有効性を比較した。さらに組織レベルに止まらず、細胞内の種々の画分について蓄積量の変動をしらべて有効性を比較判定した。

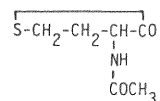
材料と方法

1) 動物と試薬

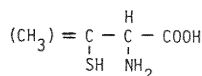
動物は 180~200g 体重のウィスター系雄ラットを用いた。塩化メチル水銀は 0.1M Na₂CO₃-NaHCO₃ (pH 9.2) に 10mg/ml の濃度に溶かして用いた。溶液は冷暗室 (2~4℃) のデシケーター中に保存、使用に際して不溶物が析出している時は37℃に温めて溶かしてから用いた。

塩化メチル水銀 (MMC) および亜セレン酸ナトリウム (Se) は和光純薬から、N-acetyl-DL-homocysteine thiolactone (NAHCTL), D-penicillamine (DPA) および Meso-2, 3-dimercaptosuccinic acid (DMSA) は Sigma Chem. CO. からそれぞれ購入した。これらの薬物の分子式は図 1 に示されている。²⁰³Hg-MMC

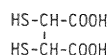
N-acetyl-D,L-homocysteine thiolactone (NAHCTL) mw=159



D-penicillamine (DPA) mw=149



2,3-Dimercaptosuccinic acid (DMSA) mw=182



Sodium selenite (Se) mw=173



Fig. 1 The chemical structure of chelating agents studied.

Table 1 Dose schedule of chelating agents

	Dose/200g b.w. mg	Number of doses	Total dose/200g b.w.	
			mg	μ mol
Saline (Control)	0.1 (ml)	10 ^a	1 (ml)	—
NAHCTL	23.9	10 ^a	239	1500
DPA	22.4	10 ^a	224	1500
DMSA	5.0	10 ^a	50	275
Se	0.1	5 ^b	0.5	2.9

a, Dosed i.p. every 12h.

b, Dosed i.p. every 24h.

(930mCi/m mol) は New England Nuclear (Boston, Mass) から購入した。

2) MMC および薬物の投与方法

ラット 3 匹を一群とし、対照群、NAHCTL 群、DPA 群、DMSA 群、Se 群の 5 群に分けた。最初これら 15 匹のラットのそれぞれに、体重 200g 当り 0.5mg (1.98 μ mol) の MMC と 25 μ Ci の ²⁰³Hg-MMC をまぜて腹腔内注射をした。15時間を経過した時点で対照群には生理食塩水、薬物群にはそれぞれの薬物の第 1 回目の腹腔内注射を行ない、以後 12 時間ごとに合計 10 回投与した。

なお Se の場合のみ 24 時間ごとに合計 5 回投与した。

これらの投与方法は表 1 にまとめて示されている。DMSA 以外の薬物は生理食塩水に溶かして用いたが、DMSA は 8.6% NaHCO₃ に溶かして使用した²⁰⁾。薬物の最終投与後 15 時間を経過した時点で、ネブタール麻酔下 (35 mg/kg) 1.25 単位/ml のヘパリンを含む 300ml の生理食塩水で全身灌流を行なった。MMC 投与対照群では生理食塩水の最終投与後 15 時間で同様の全身灌流を行なった。灌流終了後断頭し組織を採取した。なおラットは断頭以前の 16 時間絶食した。

3) 組織、血液の採取および細胞分画法

全身灌流後肝・腎・脳を採取し以下のように操作した。血液は灌流時胸腔にあふれてきた血液をヘパリン採血を行なった。

i) 肝の細胞分画法

ラット 3 匹分の肝をプールし、3 倍容の 320mM 蔗糖-10mM MgCl₂ で磨砕後 4 層ガーゼで濾過し 1000 \times g で 10 分間遠心した。沈澱は核の分画にまわし、上清は 50mM Tris-HCl, pH 7.6, 25mM KCl, 320mM 蔗糖, 10mM MgCl₂ (以下 T₅₀K₂₅S₃₂₀M₁₀ と記す) に調整して 12000 \times g, 10 分間遠心した。沈澱を再度同溶媒に分散後 8000 \times g, 15 分間遠心して得た沈澱をミトコ

ンドリア画分とした。一方上清は T₅₀K₂₅S₅₅₀M₁₀ の上に重層して 100000 \times g, 90 分間遠心し、沈澱をミクロソーム画分、上清を細胞質 (サイトゾル) 画分とした。

さらに T₅₀K₂₅S₃₂₀M₁₀ に分散したミクロソーム画分の 2/3 にデオキシコロール酸 (Na 塩) を 1% に加えた後 T₅₀K₂₅S₅₅₀M₁₀ に重層して 120,000 \times g, 90 分間遠心して得た沈澱をリボソーム画分とした。また最初の 1000 \times g の遠心で得た核画分から東中川・村松の方法²¹⁾に従って核を精製し、さらに核小体およびクロマチン画分を分離した²²⁾。

ii) 腎の細胞分画法

ラット 3 匹分の腎をプールし、4 倍容の S₃₂₀M₁₀ で磨砕後 4 層ガーゼで濾過し 1000 \times g で 10 分間遠心した。沈澱は核の精製にまわし、上清から上記の肝の場合と同様な操作でミトコンドリア画分、ミクロソーム画分、リボソーム画分、サイトゾル画分を調製した。最初の 1000 \times g の遠心で得た沈澱から東中川・村松の方法²¹⁾に従って核を精製した。

iii) 脳の細胞分画法

ラット 3 匹分の脳をプールし、4 倍容の S₃₂₀M₁ で磨砕後 1000 \times g で 10 分間遠心した。沈澱からは Thompson の方法²³⁾に従って神経細胞核 (N₁) およびグリア細胞核 (N₂) を分離精製した。上清は上記の肝の場合と同様な操作を行なって、ミトコンドリア画分、ミクロソーム画分、リボソーム画分、サイトゾル画分を調製した。

iv) 血液の分画法

ヘパリン採血した血液から藤井の方法²⁴⁾に従ってプラズマ、血球内成分 (主としてヘモグロビン)、ストローマを分離精製した。

4) ゲル濾過法

25ミリ (径) \times 400ミリ (高さ) の Ultrogel ACA 44 (LKB 社) を用いて行なった。平衡化および溶出液は 10

mM Tris-HCl, 100mM NaCl (pH 8.2) を用いた。

5) 放射能測定法

種々の画分の放射能の測定は NaI 結晶ウェル型シンチレーションカウンター (Aloka, JDC 601) を用いて行なった。減衰に対する補正を行なった後、必要な場合には各画分の水銀値を、注射した MMC の比活性に基づいて計算して求めた。

6) 蛋白定量法

種々の画分の蛋白濃度は牛血清アルブミンを標準として Lowry らの方法²⁵⁾ を用いて測定した。

7) 腎サイトゾル中のメチル水銀と無機水銀の分離定量

Omata らの方法²⁶⁾ に準じて実施した。概略を記すと、測定試料に濃塩酸を 2N になるように加え、3~4 容のベンゼンを加えて激しく振盪したのち遠心分離しベンゼン層を取り除く。このベンゼン抽出を合計 6 回行ない、各ベンゼン層および残った水層の放射能を測定した。ベンゼン層の放射能の総和をメチル水銀、水層の放射能を無機水銀とした。

結 果

1) 組織水銀値に対する薬物投与の効果

200g 体重あたり 0.5mg の MMC をラットに 1 回注射後、表 1 に示したようにして 3 種の薬物および Se を投与した場合の脳・肝・腎・血液の水銀値を表 2 に示した。生理食塩水を投与した対照群では血液が最も高く、腎・肝・脳の順に低くなっている。薬物投与による水銀値の低下を組織ごとに比較してみると、まず肝では低下効果は DMSA>DPA>Se>NAHCTL となり、腎では DPA≒DMSA>Se>NAHCTL、脳では DMSA>DPA>NAHCTL>Se (逆に対照より上昇)、血液では DPA≒DMSA>NAHCTL>Se となった。これら

を総合すると最も大きな効果を示したのは DMSA であった。DPA の効果もこれに近いが脳・肝の水銀値の低下の点では DMSA の方がまさっていた。Se も肝・腎・血液の水銀値についてはかなりの低下効果を示したが、脳の水銀値の顕著な上昇は Se に特徴的で他の薬物の場合には見られなかったことである。NAHCTL には著明な水銀値低下効果は見られず、特に肝と腎では生理食塩水を投与した対照群に近い値であった。

2) 細胞内画分の水銀値に対する薬物投与の効果

組織に蓄積した水銀は種々の細胞内部位に蓄積しておりしかも細胞内の各部位に均一に分布蓄積しているわけではないと考えられる。よって組織細胞の超遠心分画を行なって種々の細胞画分を分離調製し、これらの諸画分の水銀値に対する薬物投与の効果を調べた。組織の超遠心分画にあたってはかなり複雑な操作を実施するので、データの正確度をあげるため各画分の収量の変動の影響をうけない mg 蛋白あたりの水銀値を求めて比較することとした。肝・腎・脳の種々の細胞画分および血液は血球とプラズマ、さらに血球をストローマと血球内成分 (主としてヘモグロビン) に分けて測定を行なった結果をまとめて表 3 に示した。表 3 には各画分について mg 蛋白あたりの水銀 c.p.m. 値、これと対照群の値との比較値 (% of Saline) とを示してある。

対照群の細胞画分のうち肝・腎・脳のいずれの場合も最も水銀値の高いのはサイトゾルである。ついでミトコンドリア、マイクロソームであるがリボソームがこれについている。肝ではマイクロソームよりリボソームの方がわずかに高い値を示した。肝・腎の核はこれらにくらべてかなり低い水銀値を示したが、脳では神経細胞核とグリア細胞核のいずれもリボソームの水銀値に近い値を示した。脳のサイトゾルおよびミトコンドリアの水銀値は肝のそれらとくらべると半分以下の低い値を示したが、脳

Table 2 Effect of chelating agents on the retention of mercury in tissues and blood of rats treated with methylmercury

	Saline			NAHCTL		DPA		DMSA		Se	
	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Liver	46,640	41,700	89	24,850	53	16,430	35	30,800	66		
Kidney	162,700	158,900	98	77,600	48	82,060	50	112,950	69		
Brain	15,420	10,230	66	8,940	58	7,130	46	22,400	145		
Blood*	302,000	158,900	53	99,380	33	104,500	35	171,000	57		

A, cpm/g tissue (mean of three rats).

B, % of saline.

* cpm/ml blood.

Table 3 Effect of chelating agents on the retention of mercury in subcellular fraction of tissues of rats treated with methylmercury chloride

	Saline	NAHCTL		DPA		DMSA		Se	
	A	A	B	A	B	A	B	A	B
Liver									
Nuclei	126	79	63	53	42	36	29	69	55
Chromatin	91	61	67	38	42	28	31	74	81
Nucleoli	57	71	125	38	67	36	63	66	116
Mitochondria	353	243	69	159	45	186	53	233	66
Microsomes	216	158	73	102	47	66	31	133	62
Ribosomes	232	154	66	103	44	84	36	112	48
Cytosol	573	448	78	262	46	184	32	341	60
Kidney									
Nuclei	322	260	81	179	56	144	48	369	115
Mitochondria	831	704	85	491	59	409	49	765	92
Microsomes	839	735	88	517	62	395	47	672	80
Ribosomes	695	423	61	376	54	265	38	674	97
Cytosol	2700	2740	101	1280	47	1210	45	1590	59
Brain									
Nuclei (N ₁)	118	72	61	53	45	50	45	116	98
Nuclei (N ₂)	104	52	50	60	58			147	141
Mitochondria	158	108	68	81	51	74	47	198	125
Microsomes	165	105	64	73	44	75	45	202	122
Ribosomes	119	75	63	59	50	53	45	173	145
Cytosol	264	206	78	154	58	139	53	436	165
Blood									
Corpuscles	2010	1030	51	625	31	692	34	1150	57
Cell content	2230	1040	47	662	30	734	33	1340	60
Stroma	199	199	100	63	32	62	31	226	114
Plasma	33	31	94	18	55	19	58	69	209

A, cpm/mg protein.

B, % of saline.

の核は肝の核に近い水銀値を示した。表 2 では血液が最高の水銀値を示したが、表 3 の mg 蛋白あたり得水銀値では腎のサイトゾルの方が赤血球ヘモグロビンよりもやゝ高い値を示した。プラズマおよびストローマ画分は低い水銀値を示したが、プラズマは特に低い値であった。

さて肝の細胞画分の水銀値に対する薬物投与の効果は、

細胞画分の全般にわたって水銀値の低下が見られた。NAHCTL 投与の場合は、核小体画分が対照群の125%という高い水銀値を示した。他の画分ではサイトゾル画分が対照群の78%であったがその他の画分では63~73%の範囲の低下を示した。DPA 投与の場合は、核小体画分で対照群の67%、他の画分では42~47%とほぼ同程度の低下を示した。DMSA 投与の場合は、核小体画分が対

照群の63%、ミトコンドリア画分が53%で、他の画分は29~36%と最も低い水銀値を示した。Se 投与の場合は、核小体画分の水銀値が対照群の116%と高くなり、クロマチン画分がそれについて81%、他の画分は48~66%の範囲で低下を示した。以上の結果からすべての薬物に共通して核小体画分の水銀値の低下が他の細胞画分にくらべて少なく、NAHCTL と Se の場合には対照群より逆に高い値を示した。薬物の水銀値低下効果の順は、DMSA>DPA>Se>NAHCTL、と結論された。

腎の細胞画分では、NAHCTL 投与の場合サイトゾル画分の水銀値は対照群の101%とほとんど低下を示さなかったが、リボソーム画分では61%、他の3画分では81~88%の範囲の低下を示した。DPA 投与の場合にはサイトゾル画分の水銀値が最も低くて対照群の47%、他の画分は54~62%の範囲で低下を示した。DMSA 投与の場合にはリボソーム画分の水銀値が他よりやや低くて対照群の38%であったが、他の画分は45~49%の低下を示した。Se 投与の場合では、核画分の水銀値が対照群の115%とやや上昇を示した。サイトゾル画分では最も低い59%、他の3画分では80~97%の範囲の低下を示した。薬物の水銀値低下効果は総体的に見て肝の場合とほぼ同様に DMSA>DPA>Se≒NAHCTL であると云えるが、Se と NAHCTL の効果は細胞画分によって異なるためどちらが効果が大きいと一概には云えなかった。

脳の細胞画分では、NAHCTL 投与の場合サイトゾル以外の画分では50~68%の範囲に水銀値の低下が見られたが、サイトゾル画分ではやや高い78%にしか低下しなかった。神経細胞核 (N₁) とグリア細胞核 (N₂) では N₂ の方が水銀値低下が大きかった。DPA 投与の場合、すべての細胞画分に44~58%の範囲で水銀値低下が見られた。核では NAHCTL の場合と逆に N₁ の方の低下が著しかった。DMSA 投与の場合もすべての細胞画分に45~53%の範囲に水銀値低下が見られた。Se 投与の場合は表 2 で示した組織水銀値上昇の特徴に一致して N₁ を除くすべての細胞画分に水銀値の上昇が見られた。N₁ と N₂ を比較すると水銀値上昇は N₂ (グリア細胞核) に顕著に認められた。水銀値上昇はサイトゾル画分が最も大きく165%、リボソーム145%とグリア細胞核141%がこれにつき、ミトコンドリアおよびマイクロソーム画分ではそれぞれ125%および122%であった。薬物の水銀値低下効果は DMSA≒DPA>NAHCTL>Se と判定された。

血液の場合は、NAHCTL 投与ではストローマとプラズマの水銀値に対しては全く効果を示さなかったが、

血球内成分 (ヘモグロビン) の水銀値に対しては明らかな低下効果を示した。DPA 投与の場合はストローマと血球内成分の水銀値に対して顕著な低下効果 (32%および30%) を示したが、プラズマの水銀値の低下は55%とやや程度が低かった。DMSA 投与の場合も DPA 投与の場合とほぼ同様な水銀値低下を示した。Se 投与ではプラズマの水銀値は対照値の209%に増加し、ストローマではほぼ変らぬ水銀値114%を示し、血球内成分では対照の60%に低下した。これらの結果からプラズマ画分の水銀値は血球画分にくらべて低下しにくい性質を有するといえよう。また DPA および DMSA は血液の水銀値の低下に有効であること、NAHCTL および Se は血球の水銀値低下にはかなり有効であるがプラズマの水銀値低下には効果を示さないことがわかった。

3) 腎サイトゾル画分のゲル濾過クロマトグラフィー

水銀の蓄積は血液以外の組織では腎が最も高い。表 3 によれば腎組織細胞の画分ではサイトゾルが最も高い水銀蓄積値/mg 蛋白質を示した。そこで腎サイトゾル画分をゲル濾過クロマトグラフィーにかけて種々の分子量の蛋白質画分の水銀値の薬物投与による変動を詳細に示らばと試みた。

図 2-control に対照群から得た腎サイトゾルのクロマトグラムを示した。ピークMはメタロチオンンに結合した放射能のピークと推定され²⁷⁾、図中に分布する全放射能の23.9%を占めた。MMC 投与ラットの腎のサイトゾルは日数の経過と共に無機水銀の蓄積が最も高く見られる画分であることが知られているが²⁶⁾、表 4 に示したようにサイトゾルの全水銀のうち34.7%が無機水銀であった。またメタロチオンンにはメチル水銀は結合しにくいことが知られているが²⁸⁾、これに一致してピークMの放射能の95%が無機水銀であった。ピークMより高分子側の放射能はより高分子量の蛋白質画分に結合したメチルあるいは無機水銀の放射能である。またピークMより低分子側の吸収ピークは非蛋白質性低分子物質の吸収によるものである。図 2-NAHCTL は NAHCTL 投与の場合の腎サイトゾルのクロマトグラムであるが、ピークMが41.3%と増加した (表 4)。また control にくらべ蛋白質結合放射能のカーブにも若干の変化が見られた。図 2-DPA には DPA 投与の場合の腎サイトゾルのクロマトグラムを示したが、ピークMは19.1%と減少した。図 2-DMSA は DMSA 投与の腎サイトゾルのクロマトグラムである。ピークMは24.4%と control とほとんど変わらないが、さらに低分子側に13.4%を占める新たな放射能ピークLが出現した。DMSA

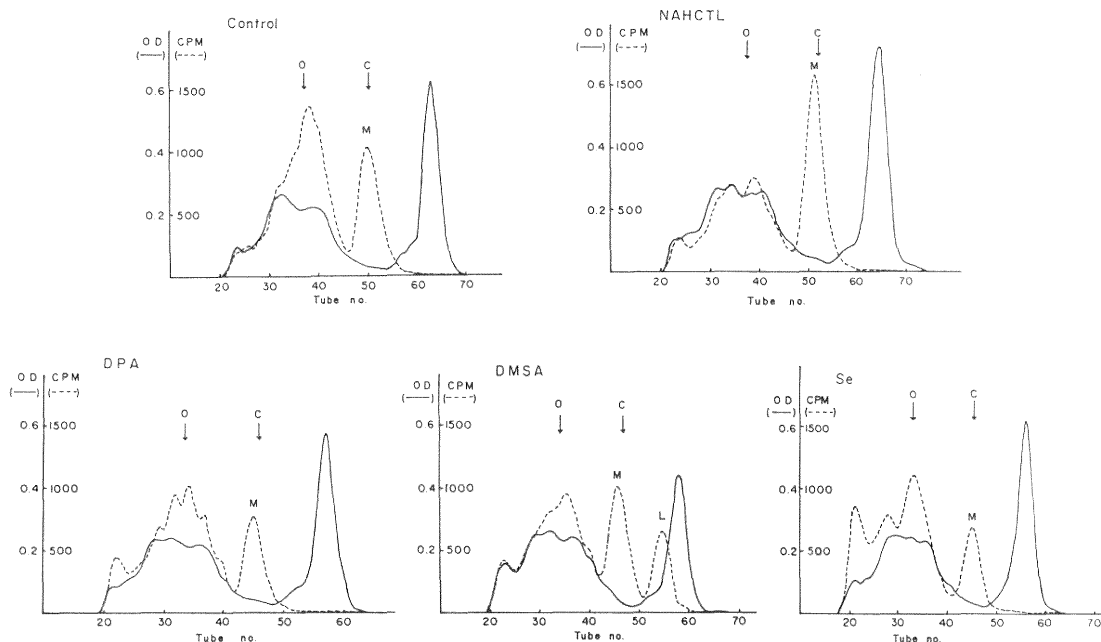


Fig. 2 Gel filtration of kidney cytosol on Ultrogel ACA 44. O: ovalbumin (45,000); C: cytochrome C (12,500). M and L indicate the peak of metallothionein and low molecular weight substance, respectively. Optical density (OD) was measured at 280nm.

Table 4 Inorganic mercury in cytosol fraction of kidney after injection of methylmercury chloride followed by doses of chelating agents

	% Inorganic mercury in cytosol fr. of kidney	% Radioactivity in peak M*
Saline	34.7	23.9
NAHCTL	65.7	41.3
DPA	47.6	19.1
DMSA	57.6	24.4
Se	48.9	16.9

*, Radioactivity in peak M was almost (>95%) as inorganic.

に結合している放射能と推定されるが本実験ではこれを証明する試みはなされなかった。図2-SeはSe投与の場合の腎サイトゾルのクロマトグラムである。ピークMは16.9%と減少したが、最も高分子側の蛋白質結合放射能が明らかに増加した。表4には対照群および薬物投与群から得た腎サイトゾル中の無機水銀の全水銀に対する%が示されている。この結果から4種の薬物投与はいずれも腎サイトゾル中の無機水銀の%を上昇させる

作用を有することが明らかとなった。この上昇作用はNAHCTLに最も強く見られた。薬物投与群の中では無機水銀の%の上昇作用の大きさとピークMの放射能の%との間に或程度の関連性が見られた(表4)。

考 察

本実験でMMCを投与したラットに図1に示した3種のSH化合物と亜セレン酸ナトリウムを投与し、

組織および組織細胞内の諸画分の水銀値がどのような変動を示すかを比較検討した。本実験で用いた MMC 投与条件ではラットに神経中毒症状は全く見られず、また体重、外観ともに影響はほとんど認められなかった。この MMC 量の単一投与後15日まで組織の水銀蓄積量を測定してみたが、肝では投与から2日以後徐々に低下、腎では投与2日以後徐々に増加、脳では投与2日以後徐々に増加して6日でピークを示し以後徐々に減少、血液では投与後2日、6日と一定値を示すが以後減少して15日で1/2となった。このように MMC 投与後徐々に減少する肝を除いて腎、脳、血液ともに6日までは水銀蓄積値が徐々に増加するか一定値を保つので本実験ではこの MMC 投与条件を採用し、MMC 投与後15時間を経過した時点から薬物の投与を開始し、MMC 投与後ほぼ6日の時点で殺して水銀蓄積値の測定を行なった。

表2からわかるように血液の水銀蓄積値は脳のそれにくらべると20倍近くも高い値を示している。従って灌流操作を行なわないで組織を採取した場合混入血液の影響を受けるおそれが充分にある。magosら¹²⁾は灌流を行なわないと脳の水銀蓄積値が70~80%も高い値を示すことを指摘した。また核画分の調製品に赤血球が混入する恐れもある。そこで本実験では充分灌流を行なってから組織を採取し、核画分の調製には高張蔗糖溶液を用いる精製法²¹⁾²²⁾を採用して各組織、組織細胞内画分への血液特に赤血球混入の恐れを排除した。

本実験で用いた3種の薬物のうち、肝、腎、脳、血液さらにそれぞれの細胞画分あるいは血球、プラズマについての検討の結果、水銀蓄積値を低下させる効果の最も強い薬物は DMSA であることが明らかとなった。また DPA も効果が強く DMSA に近い効果を示した。NAHCTL はこれらの両者にくらべて水銀値低下の効果は弱く、肝核小体の水銀値は逆に若干上昇の傾向を示したし、腎サイトゾル、ストローマ、プラズマなどについては全く効果を示さなかった。Aasethら⁷⁾¹¹⁾²⁹⁾も MMC 投与ラットあるいはマウスの組織水銀値に対する NAHCTL の効果をしらべ、DPA や NAPA (N-acetyl-DL-penicillamine) よりも水銀値低下作用が弱いことを報じている。MMC 投与ラットにおける水銀の排泄あるいは組織水銀値の低下の目的に DMSA が強い効果を示すことは多くの研究者によって報じられている。Planas-Bohne¹⁴⁾は DMSA が NAPA や DMPS (2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate, BAL-sulf) よりも効果がすぐれていることをのべ、Aasethら³⁰⁾は *in vitro* の実験で赤血球やヘパトサイトへのメチル水銀の

取り込みおよび予め取り込ませたメチル水銀の除去などの効果を比較し、DMSA が BAL, Thiola (2-mercaptopropionylglycine), DDC (Diethyldithiocarbamate) などより強い取り込み阻害あるいは除去効果を示すことを報じた。Planas-Bohneら¹³⁾も赤血球からメチル水銀を除去する効果を比較し、DMSA > DMPS > NAPA = DPA と報じたが、これはまた *in vivo* の実験でも確かめられた¹⁴⁾。また Galeら¹⁸⁾は MMC 投与ラットの体外への水銀排泄効果を比較し、DMSA が DDC より効果がすぐれている事を報じ、Kostniakら³¹⁾は脳の水銀値低下に DMSA が有効であることを述べている。このように DMSA が顕著な組織水銀値の低下作用をもつことは本実験においても明らかにされたが、この薬物は毒性の面においても他の薬物よりすぐれている。Planas-Bohneら¹³⁾は DMSA, DPA, BAL の LD₅₀ がマウスの場合それぞれ 30m mol SH/kg (3g/kg), 25m mol SH/kg (2g/kg), 1.5m mol SH/kg (90mg/kg), と報じ、Aposhian³²⁾および Planas-Bohne³³⁾も DMSA は DMPS より毒性が低いことを述べている。本実験では全投与量 250mg/kg の DMSA を用いたが、この量は上記の LD₅₀ 値の 1/12である。Planas-Bohneら¹³⁾は LD₅₀ の 1/3 量の 1g/kg を1週間投与しても何の支障もないと述べている。また DPA の全投与量は上記の LD₅₀ 値の 1/3.3 となり、DMSA と DPA では組織水銀値の低下効果に大差はなかったが、毒性の面を考慮すれば DMSA の方がすぐれていることが明らかである。NAHCTL の毒性も低いことが報じられている⁶⁾が、DMSA の約5倍量を投与した本実験の結果でも水銀値低下効果は DMSA にくらべはるかに弱かった。BAL はメチル水銀と安定な複体を形成するが、脳への再分布と著しい毒性のため実用に適さないことが報じられている。以上の動物実験による結果がそのまま人に適用されるか否かについては更に充分な検討を要する問題であろう。

Se のメチル水銀毒性軽減効果はすでによく知られた事実であり³⁴⁾³⁵⁾、最も効果的な Se 化合物は本実験で用いた亜セレン酸である³⁶⁾。亜セレン酸の水銀毒性軽減効果はメチル水銀の体外排泄を促進することによるのではなく、これまでいくつかの假説が提出されている³⁷⁾。MMC と亜セレン酸の同時投与時に認められる最も特徴的な現象の一つに脳への Hg と Se の蓄積の増加があげられている³⁵⁾³⁸⁾。本実験でもこれと一致して脳への水銀蓄積の顕著な増加が認められた(表2)。しかし脳以外にも肝核小体、腎の核、プラズマおよびス

トローマなどの画分にも水銀蓄積の増加が見られ、また腎の核以外の画分の水銀蓄積値の低下は他の薬物の場合よりも低かった(表3)。核小体以外の肝細胞内画分および血球内成分(主としてヘモグロビン)への水銀蓄積に対してはNAHCTL投与の場合と同程度の低下効果が見られた。これらの現象とSeのメチル水銀毒性軽減効果の機作の間に何らかの関連があるものと思われるがそれは今後の検討にまたねばならない。永沼ら³⁹⁾は水銀を投与したラットに亜セレン酸を投与して得た肝サイトゾルをSephadex G-200でゲル濾過すると、水銀単独投与の場合と異なり水銀の大部分はvoid volume(V_0)に溶出されるが、腎サイトゾルではこのような現象は認められないことを報じた。一方Chenら⁴⁰⁾はMMCと亜セレン酸と同時に投与した場合には、血液や臓器可溶性画分のゲル濾過パターンはMMCまたは亜セレン酸を単独で投与した場合とほとんど変らなかつたと報じた。本実験では、MMC投与後亜セレン酸を投与したラットから得た腎サイトゾルのゲル濾過パターンにおいて、高分子量域特に V_0 に溶出される ^{203}Hg -放射能ピークの顕著な増大を認めた(図2)。腎サイトゾル中の無機水銀の%が増加(表4)しているにも拘らずほとんど無機水銀のみが結合しているメタロチオネンピークが減少している(表4)ので、その差にあたる無機水銀がSeとともに高分子複合体⁴¹⁾を形成して V_0 に溶出されたとも推定されるが詳細は現時点では不明である。

MMC投与後DMSAを投与した場合の腎サイトゾル中のみ認められた低分子放射能ピークは恐らくDMSAと水銀の複合体に相当するものと推定される。DMSAの高い水銀蓄積低下効果を反映している現象かもしれない。

MMC投与ラットの体内では、機作は不明であるがメチル水銀の無機水銀への分解(Biotransformation)がおこり、結果として腎組織内に存在する無機水銀量およびメチル水銀に対する無機水銀の比率が経日的に増加してゆくことが知られている²⁶⁾⁴²⁾。この増加はサイトドルに最も顕著に認められた²⁶⁾。今回の実験ではメチル水銀をより排泄され易い無機水銀に変えるBiotransformationが薬物の投与によって促進されることを示唆する結果が得られたことは興味深い。

これまで体外への水銀の排泄あるいは体内蓄積水銀値の低下について種々の薬物の効果が多くの研究によって知られたが、そのほとんどが組織、臓器レベルで行われたものであった。本研究では更にこれを細胞内画分

のレベルにおいて薬物の効果を詳細にしらべた。その結果種々の細胞内画分の水銀値が必ずしもみな一様の変動を示していないことが判明した。この事実は薬物の効果の判定の際に一つの留意点を提供すると同時に薬物効果の解析、作用機作の解明に将来手がかりを与える点においても意義があると考えられる。

結 語

Dimercaptosuccinic acid (DMSA), D-Penicillamine (DPA), N-acetyl-D, L-homocysteine thiolactone (NAHCTL), 亜セレン酸 (Se) について、メチル水銀投与ラットの組織ならびに細胞内諸画分の水銀蓄積値低下効果を比較検討して次の成績を得た。

1. 肝と脳ではDMSA>DPA>NAHCTL、腎と血液ではDMSA≒DPA>NAHCTLの順の水銀値低下効果を示した。Seは肝、腎ではDMSA, DPAに次ぐ効果を示したが、血液では最下位であり、脳ではかえって対照値の145%にも上昇をもたらした。

2. 細胞内諸画分に対しても薬物の水銀値低下効果はDMSAが最高でDPAが僅差でこれに次ぎ、NAHCTLとSeの効果は低かった。

3. 肝の細胞画分のうち核小体の水銀値はいずれの薬物の場合にも低下しにくい傾向が見られた。NAHCTLとSeはかえって対照値より水銀値を上昇させた。

4. Seは神経細胞核を除く脳細胞諸画分、腎細胞核、プラズマ、ストローマなどの水銀値を対照より上昇させた。

5. 薬物投与群の腎サイトゾルでは全水銀に対する無機水銀の比率の増大が見られ、薬物投与がメチル水銀の無機化を促進する可能性が示唆された。

6. 腎サイトゾルのゲル濾過クロマトグラフィーから、Se投与の場合最も高分子量域蛋白質に結合する水銀量が増加したこと、無機化率の最高のNAHCTLの場合にメタロチオネンピークが最大であったこと、水銀値低下効果の最大のDMSAの場合にDMSA-Hgと推定される低分子量ピークが出現したこと、などが観察された。

7. 以上の結果、組織および細胞画分レベルにおいて水銀値低下効果が最も大きく、LD₅₀値から低毒性と推定されるDMSAが体内メチル水銀の低減の目的に最も有効であると結論された。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました新潟大学脳研究所高橋康夫教授、理学部菅野浩教授、理学部小俣三郎教授に深謝いたします。また

本研究に御協力頂きました崎村建司先生、佐藤充先生に心から感謝いたします。

参 考 文 献

- 1) Refsvik, F. and Norseth, T.: Methylmercuric compounds in rat bile. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **36**: 67~78, 1975.
- 2) Omata, S., Sakimura, K., Ishii, T. and Sugano, H.: Chemical nature of a methylmercury complex with a low molecular weight in the liver cytosol of rats exposed to methylmercuric chloride. *Biochem. Pharmacol.*, **27**: 1700~1702, 1978.
- 3) Thomas, D.J. and Smith, J.C.: Partial characterization of a low molecular weight methylmercury complex in rat cerebrum. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **47**: 547~556, 1979.
- 4) 高橋 等: Hg, 吸収, 排泄, 体内分布. *総合臨床*, **23**: 37~45, 1974.
- 5) 広田絃一: メチル水銀の臓器内移行と D-penicillamine の水銀排泄効果に関する研究. *臨床神経学*, **9**: 592~601, 1969.
- 6) Aaseth, J.: The effect of N-acetylhomocysteine and its thiolactone on the distribution and excretion of mercury in methylmercuric chloride injected mice. *Toxicol.*, **36**: 193~202, 1975.
- 7) Aaseth, J.: Mobilization of methylmercury in vivo and in vitro using N-acetyl-DL-penicillamine and other complexing agents. *Acta Pharmacol.*, **39**: 289~301, 1976.
- 8) Suzuki, T., Shishido, S. and Ishihara, N.: Different behavior of organic and inorganic mercury in renal excretion with reference to effects of D-penicillamine. *Br. J. Ind. Med.*, **33**: 88~91, 1976.
- 9) Gabard, B.: Treatment of methylmercury poisoning in the rat with sodium 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate: Influence of dose and mode of administration. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **38**: 415~424, 1976.
- 10) Magos, L.: The effects of dimercaptosuccinic acid on the excretion and distribution of mercury in rats and mice treated with mercuric chloride and methylmercuric chloride. *Br. J. Pharmacol.*, **56**: 479~484, 1976.
- 11) Aaseth, J.: The effect of N-acetylpenicillamine on the distribution of methylmercury and inorganic mercury in mice. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **41**: suppl. II, 422~426, 1977.
- 12) Magos, L., Peristianis, G.C. and Snowden, R.T.: Postexposure preventive treatment of methylmercury intoxication in rats with dimercaptosuccinic acid. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **45**: 463~475, 1978.
- 13) Planas-Bohne, F. and Olinger, H.: The interaction of chelating agents with methylmercury chloride bound to erythrocytes. *Biochem. Pharmacol.*, **30**: 667~669, 1981.
- 14) Planas-Bohne, F.: The influence of chelating agents on the distribution and biotransformation of methylmercuric chloride in rats. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **217**: 500~504, 1981.
- 15) Thomas, D.J. and Smith, J.C.: Effects of coadministered low-molecular-weight thiol compounds on short-term distribution of methylmercury in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **62**: 104~110, 1982.
- 16) Refsvik, T.: The influence of some thiols on biliary excretion of methylmercury. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **52**: 22~29, 1983.
- 17) Refsvik, T.: The mechanism of biliary excretion of methylmercury: studies with methylthiols. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **53**: 153~158, 1983.
- 18) Gale, G.R., Atkins, L.M., Smith, A.B., Walker, E.M. and Jones, M.K.: Comparative effects of N,N-disubstituted dithiocarbamates and dimercaptosuccinate on mobilization of methylmercury in mice. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **45**: 119~135, 1984.
- 19) Refsvik, T.: N-acetylpenicillamine potentiated excretion of methylmercury in rat bile: Influence of S-methylcysteine. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **55**: 121~125, 1984.
- 20) Hughes, J.A. and Sparber, S.B.: Reduction

- of methylmercury concentration in neonatal rat babies after administration of dimercaptosuccinic acid to dams while pregnant. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **22**: 357~363, 1978.
- 21) Higashinakagawa, T. and Muramatsu, M.: Ribosome precursor particles in the nucleolus of rat liver. *Eur. J. Biochem.*, **42**: 245~258, 1974.
- 22) Ishikawa, K., Sato, T., Sato, S. and Ogata, K.: Ribonucleoprotein complex containing nascent DNA-like RNA in the crude chromatin fraction of rat liver. *Biochim. Biophys. Acta.*, **353**: 420~437, 1974.
- 23) Thompson, R.J.: Studies on RNA synthesis in two populations of nuclei from the mammalian cerebral cortex. *J. Neurochem.* **21**: 19~40, 1973.
- 24) 藤井達三: 赤血球膜の脂質と金属イオン分析法, 生体膜実験法上巻(蛋白質・核酸・酵素別冊), pp. 129~137, 共立出版, 1974.
- 25) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**: 265~275, 1951.
- 26) Omata, S., Sato, M., Sakimura, K. and Sugano, H.: Time-dependent accumulation of inorganic mercury in subcellular fractions of kidney, liver and brain of rats exposed to methylmercury. *Arch. Toxicol.*, **44**: 231~241, 1980.
- 27) Piotrowski, J.K., Trojanowska, B. and Sapota, A.: Binding of cadmium and mercury by metallothionein in the kidneys and liver of rats following repeated administration. *Arch. Toxicol.*, **32**: 351~360, 1974.
- 28) Chen, R.W., Ganther, H.E. and Hoekstra, W.G.: Studies on the bindings of methylmercury by thionein. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**: 383~390, 1973.
- 29) Aaseth, J., Wannag, A. and Norseth, T.: The effect of N-acetylated DL-penicillamine and DL-homocysteine thiolactone on the mercury distribution in adult rats, rat fetuses and Macaca monkeys after exposure to methylmercuric chloride. *Acta Pharmacol. Toxicol.*, **39**: 302~311, 1976.
- 30) Aaseth, J., Alexander, J. and Deverill, J.: Evaluation of methyl mercury chelating agents using red blood cells and isolated hepatocytes. *Chem. Biol. Interact.*, **36**: 287~297, 1981.
- 31) Kostyniak, P.J. and Soiefer, A.I.: A methylmercury toxicity model to test for possible adverse effects resulting from chelating agent therapy. *J. Appl. Toxicol.*, **4**: 206~210, 1984.
- 32) Aposhian, H.V.: DMSA and DMPS-water soluble antidotes for heavy metal poisoning. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**: 193~215, 1983.
- 33) Planas-Bohne, F.: The effect of 2,3-dimercaptopropane-1-sulfonate and dimercaptosuccinic acid on the distribution and excretion of mercuric chloride in rats. *Toxicol.*, **19**: 275~278, 1981.
- 34) Ganther, H.E., Goudie, C., Kopecky, M.L., Wagner, P., Oh, S.H. and Hoekstra, W.G.: Selenium: reaction to decreased toxicity of methylmercury added to diets containing tuna. *Science.*, **175**: 1122~1124, 1972.
- 35) Iwata, H., Okamoto, H. and Osawa, W.: Effect of selenium on methylmercury poisoning. *Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol.*, **5**: 673~679, 1973.
- 36) 小宮和英, 小池いずみ, 河内佐十, 桜井 弘: セレンによる水銀の減毒作用に関する研究(第1報) 無機水銀の毒性に対する各種セレン化合物の減毒効果と水銀およびセレンの体内分布の関係.
- 37) 永沼 章: セレンと水銀の生体内相互作用. *衛生化学*, **29**: 173~187, 1983.
- 38) Magos, L. and Webb, M.: The effect of selenium on the brain uptake of methyl mercury. *Arch. Toxicol.*, **38**: 201~207, 1977.
- 39) Naganuma, A. and Imura, N.: Changes in distribution of mercury and selenium in soluble fractions of rabbit tissues after simultaneous administration. *Pharmacol. Biochem.*

- Behav., 13: 537~544, 1980.
- 40) **Chen, R.W., Lacy, V.L. and Whanger, P.D.:** Effects of selenium on methyl mercury binding to subcellular and soluble proteins in rat tissues. Res. Commun. Chem. Pathol. Pharmacol., 12: 297~308, 1975.
- 41) **Naganuma, A. and Imura, N.:** Properties of mercury and selenium in a high-molecular weight substance in rabbit tissues formed by simultaneous administration. Pharmacol. Biochem. Behav., 15: 449~454, 1981.
- 42) **Norseth, T. and Clarkson, T.W.:** Studies on the biotransformation of ^{203}Hg -labeled methylmercury in rats. Arch. Environ. Health., 21: 717~727, 1970.

(昭和63年12月1日受付)