有機水銀化合物処置マウスにおける血液および肝コリンエステラーゼ活性の変動

与那覇政憲, 藤春伸一, 石倉俊治

東京理科大学薬学部¹⁾

Alterations in Blood and Liver Cholinesterase Activity of Mice treated with Organic Mercury Compounds

MASANORI YONAHARA, SHINICHI FUJIHARA

and SHUNJI ISHIKURA

Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science¹⁾

(Received December 10, 1975)

Changes of the activity of cholinesterase in mice treated with organic mercury compounds were examined. Diets containing ethylmercury chloride, methoxyethylmercury chloride, and propoxyethylmercury chloride were fed to mice continuously, and the first two compounds were intraperitoneally injected in a single administration. In continuous administration, cholinesterase activity in erythrocytes increased specifically in methoxyethylmercury-treated group. In all groups, cholinesterase activities in the brain were almost unchanged, while those in plasma increased and that in liver decreased, indicating that the increased activity in plasma may be derived from the liver. After a single injection, the activity of cholinesterase and other enzymes in serum increased, and then alteration of the cholinesterase activity in subcellular fractions of the liver was observed.

It may be suggested, therefore, that organic mercury compounds have a toxic action of inducing disorders of cell function.

序 論

有機水銀中毒は特異な神経症状を主体とし, 神経病理学的にはメチル水銀は末梢および中枢神経系を選択的に障害することが知られているが, 水銀化合物の種類や中毒の状態により他の障害も生起される.²⁾ 現在, 水銀中毒の機構について生化学的にはほとんど明らかでない. 水銀化合物は SH 基に強い親和性を有し, 又, 酵素分子の他の有機配位子に対しても親和性を示すため,³⁾ 各種の

酵素系を阻害し, 種々の生化学的変化を生ずる可能性が考えられる.⁴⁾

水銀化合物のコリンエステラーゼに与える影響としては水銀蒸気経気道吸入による水銀暴露工場労働者の血清コリンエステラーゼ活性の低下,⁵⁾ 血球アセチルコリンエステラーゼ活性の増加,⁶⁾ および動物実験における血清コリンエステラーゼ活性の低下⁷⁾ についての報告がある. 一方, 都築ら⁸⁾ は種々の水銀化合物投与マウスの臓

1) Location: 12, Funagawara, Shinjuku, Tokyo (東京都新宿区船河原12番地).

2) L. Friberg, L. Vostal (ed.), "Mercury in the Environment," Chemical Rubber Co., Press, Ohio, 1972, pp. 93-107.

3) M.C. Battigelli, M.P.H. Pittsburgh, *J. Occup. Med.*, **2**, 337 (1960).

4) T.W. Clarkson, *Biochem. J.*, **130**, 61p. (1972).

5) F. Oikawa, *J. Sci. Lab.*, **31**, 11, 82, 133 (1955); O. Wada, K. Toyokawa, T. Suzuki, S. Suzuki, Y. Yano, N. Nakao, *Arch. Environ. Health*, **19**, 485 (1969).

6) R. Nagorzanski, *Przegl. Lek.*, **24**, 293 (1968) [*C.A.*, **69**, 58104c (1968)].

7) S. Kosmider, S. Zajackowski, E. Rogowska, *Patol. Polska*, **17**, 55 (1966) [*C.A.*, **64**, 20502h (1966)].

8) 都築裕治, 三輪一智, 奥田 潤, 日本薬学会第93年会, 東京, 講演要旨集 (第3分冊), 1973, p. 64.

器中アセチルコリンエステラーゼ, コリンエステラーゼの多様性を指摘した。しかし, 有機水銀化合物によるコリンエステラーゼに対する明確な知見は不足している。

実験的肝障害にともない, 種々の酵素の肝から血清への逸脱が起こることはよく知られているが, 今回, 有機水銀化合物投与マウスにおいて血液中コリンエステラーゼ活性の増加を認め, 特に血漿又は血清における増加部分が肝からの流出を示唆する結果を得たので報告する。

実験方法

実験に用いた塩化エチル水銀 (EMC), 塩化メトキシエチル水銀 (MEMC), 塩化プロポキシエチル水銀 (PEMC), および塩化第二水銀 (MC) は前報の方法⁹⁾により得た。

動物実験 動物は体重 20 g 前後の dd Y 雄マウスを用い, くり返し投与の場合は EMC, MEMC, PEMC をそれぞれ, 水銀として 60 ppm, 500 ppm, 250 ppm に混和した粉末飼料 (オリエンタル酵母製) を連日与えた。1 回投与の場合は, 有機水銀化合物を蒸留水に溶解し, 対照群は蒸留水 (0.5 ml/20 g 体重) を腹腔内投与した。血清又はヘパリン加血漿は頸静脈より採血後, 2500 rpm, 15 分の遠心分離により得た。

肝の細胞分画は肝臓を 0.25M sucrose 中でテフロンホモジナイザーを用いて 10% ホモジネートを調製し, 8000 × g 30 分上清を 105000 × g 60 分遠心分離して得られる沈渣を microsome, 上清を可溶画分とした。

酵素活性 分光光度計は日立 181 型を用いた。コリンエステラーゼ (Ch E, 3.1.1.7 又は 3.1.1.8) 活性の測定は, 脳, 血球 Ch E, 一部の血清 Ch E, 及び *in vitro* の実験を Hestrin の方法¹⁰⁾ により行ない, その他の血清 Ch E および肝 Ch E 活性は Ellman ら¹¹⁾ および Humiston ら¹²⁾ のチオコリン法により行なった。In

vitro の場合は水銀化合物と酵素を 37° 10 分間プレインキュベートし, 基質を加え 45 分間インキュベートした。チオコリン法の場合は酵素希釈液 0.1 ml をとり, これに 6×10^{-3} M, DTNB 0.1 ml, 0.05 M トリス緩衝液 (pH 8.1) を加えて 2.9 ml とし, 25° で 5 分間インキュベートした後, 0.15 M ヨウ化アセチルチオコリン 0.1 ml を加え攪拌し, 直ちにセルに移し, 吸光度の変化を記録計にて記録させ, 基質の自己分解量を差引いて 1 分間の活性を測定した。又, Bayliss ら¹³⁾ の報告により, 62 C 47 (1:5-bis (4-trimethylammonium phenyl) pentan-3-one diiodide) を最終濃度 2×10^{-5} M に共存させたとき阻害される活性を true Ch E 活性とし, 残りを pseudo Ch E 活性とした。アリルエステラーゼ (3.1.1.2) 活性の測定は, Liberti の方法¹⁴⁾ により行なったが, 基質としては *p*-ニトロフェニル酢酸を用い, 25° で酵素液 (血清, 肝ホモジネート) を 5 分間インキュベートし, 基質を添加攪拌後, 直ちにセルに移し, 記録計にて 1 分間の活性を記録した。

血清中の グルタミン酸-オキザロ酢酸 トランスアミナーゼ (GOT), グルタミン酸-ピルビン酸 トランスアミナーゼ (GPT),¹⁵⁾ 乳酸脱水素酵素 (LDH),¹⁶⁾ アルカリ性ホスファターゼ (ALP)¹⁷⁾ および β -グルクロニダーゼ (β -G)¹⁸⁾ はそれぞれの方法により測定した。

肝 SH 含量および蛋白の定量 肝 SH 含量は Flesh の方法¹⁹⁾ に従い, 蛋白量は Lowry-Folin 法²⁰⁾ により定量した。

結 果

血液及び肝 ChE 活性の変動

有機水銀化合物混和飼料を長期間連日与えたマウスのヘマトクリット, Ch E 活性, 肝チオール含量を Table I に示した。各群 5 匹とし, 投与終了時の動物の状態は EMC 投与群では全例発症 (dolphin kick convulsion の

- 9) 与那覇政憲, 中村 俊, 石倉俊治, 衛生化学, **18**, 248 (1972).
- 10) S. Hestrin, *J. Biol. Chem.*, **180**, 249 (1945); K.B. Augustinsson, "Method of Biochemical Analysis," Vol. 5, ed. by D. Glick, Interscience Publishers, Inc., New York, 1957, p. 43.
- 11) G.L. Ellman, K.D. Courtney, V. Andres Jr., R.M. Featherstone, *Biochem. Pharmacol.*, **7**, 88 (1961).
- 12) C.G. Humiston, G.J. Wright, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **10**, 467 (1967).
- 13) B.J. Bayliss, A. Todrick, *Biochem. J.*, **62**, 62 (1956).
- 14) J.P. Liberti, *Anal. Biochem.*, **23**, 53 (1968).
- 15) S. Reitman, S. Frankel, *Amer. J. Clin. Pathol.*, **28**, 56 (1957).
- 16) 山村雄一, 織田敏次著, "臨床酵素化学," 医学書院, 東京, 1965, p. 375.
- 17) P.R.N. Kind, E.J. King, *J. Clin. Pathol.*, **7**, 322 (1954).
- 18) K. Kato, K. Yoshida, H. Tsukamoto, M. Nobunaga, N. Masuya, T. Wada, *Chem. Pharm. Bull.* (Tokyo), **8**, 239 (1960).
- 19) P. Flesh, E. Kun, *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, **74**, 249 (1950).
- 20) O.H. Lowry, N.J. Rosenbrough, A.L. Farr, R.J. Randall, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).

TABLE I. Hematocrit, SH Content of the Liver, and Cholinesterase Activity of Mice administered successively with MEMC and PEMC for 14 days, and EMC for 12 days

Treatment (conc. of mercury)	Hematocrit (%)	Liver SH content ($\mu\text{g}/100\text{ mg tissue}$)	Cholinesterase activity (%)		
			Brain	Erythrocytes	Plasma
Control (5)	48.4 $\pm$ 1.1	34.3 $\pm$ 1.5	100	100	100
EMC (5) (60 ppm)	49.6 $\pm$ 1.1	39.9 $\pm$ 1.9	95.5	133.6	167.5
MEMC (4) (500 ppm)	35.3 $\pm$ 2.8	41.1 $\pm$ 0.7	98.2	250.3	139.2
PEMC (5) (250 ppm)	43.0 $\pm$ 1.0	38.2 $\pm$ 0.5	95.3	118.8	119.6

Figures in parentheses represent the number of animals. The values for Hematocrit and liver SH content represent the mean $\pm$ SE. The activity of Cholinesterase was assayed by the method of Hestrin.

Fig. 1. Cholinesterase Activity of the Liver and Plasma of Mice administered successively with MEMC and EMC for 10 days

Figures in parentheses represent the number of animals and bars represent standard errors.

1: Control 2: EMC 3: MEMC
□: true ChE ▨: pseudo ChE

発現) し, MEMC は 1 例が発症, 1 例がやや後肢の異常を示し, PEMC 投与群は全例発症は認められなかった. アルコキシエチル水銀化合物投与群ではヘマトクリットの低下を示したが, 肝チオール含量の増加は, 非特異的にすべての投与群に認められた. ChE に関しては, 脳の活性にはほとんど影響を与えず, 血球, 血清 ChE 活性共に増加を示し, 血球における活性の増加は MEMC に特異的であり, 血漿における活性の増加はすべての化合物にみられるが, EMC の影響は顕著であった.

Fig. 2. Arylesterase Activity of the Liver and Plasma of Mice administered successively with MEMC and EMC for 10 Days

Figures in parentheses represent the number of animals and bars represent standard errors.

1: Control 2: EMC 3: MEMC

一方, ヘマトクリットの低下は塩化メチル水銀投与ラットでも認められることが報告されており,²¹⁾ アルコキシエチル水銀化合物特有の現象ではない. 又, MEMC 投与群のヘマトクリットの低下と血球 ChE 活性の増加との関連性は明らかではない. 肝チオール含量の増加は metallothioneine 合成の誘起によることも考えられるがこれについては不明である.

Fig. 1, 2 に EMC, MEMC, 連続投与後の血漿および肝の ChE, アリルエステラーゼ活性を示した. 血漿総 ChE 活性の増加については, 両投与群において true および pseudo ChE 活性の増加によることが認められた. 一方, 肝における総 ChE 活性は低下し, EMC 投

21) 奥田 潤, 都築裕治, 佐藤隆司, 藤井達三, 日本薬学会第94年会, 仙台, 講演要旨集 (第3分冊), 1974, p. 155.

与群では true および pseudo Ch E 共に減少するが、MEMC 投与群においては pseudo Ch E 活性のみが減少した。アリルエステラーゼ活性は、肝においては両投与群共に著明に減少したが、血漿の活性は微に変動しているにすぎない。

このような *in vivo* における酵素活性の変動を検索するため、*in vitro* で水銀化合物の濃度による影響について検討した。

Table II に血漿 Ch E に対する *in vitro* の結果を示した。血漿 Ch E に対しては活性化は認められず、EMC、MEMC は 10^{-4} M 以上の濃度で活性を抑制し、MC は 10^{-5} M レベルで抑制した。

TABLE II. Effect of Varying Concentrations of Mercury Compounds on the Activity of Plasma Cholinesterase

Concentration (M)	Plasma cholinesterase activity (%)		
	MC	MEMC	EMC
1.6×10^{-3}	—	74.0	69.4
8.0×10^{-4}	—	87.8	83.8
4.0×10^{-4}	0	92.9	89.9
1.0×10^{-4}	22.2	99.5	99.6
5.0×10^{-5}	60.4	—	—
1.0×10^{-5}	97.6	96.7	100

マウスの血球 Ch E に対して MC, MEMC, EMC の 1×10^{-3} M 以下では活性に影響を与えず、肝では EMC, MEMC の 8×10^{-4} M 以下では阻害は全く認められないが、MC の 4×10^{-4} M で完全に抑制され、 2×10^{-4} M では約 40% 阻害を示した。上記の連続投与実験による水銀の肝臓中濃度は約 5×10^{-4} M ($100 \mu\text{g Hg/g liver}$) 附近である。これより、有機水銀化合物投与マウスの肝における Ch E 活性の減少が、体内で生成した無機水銀による抑制に起因している可能性が考えらる。しかし、測定対

象酵素に対して作用する水銀濃度は、組織中に内在性の SH 基を有する物質により水銀がある程度消費されてしまうことが予想されるため、実際にはより低濃度での水銀化合物の影響が測定酵素に対して関与するものと思われる。従って、肝臓に $100 \mu\text{gHg/g liver}$ の濃度となるように MC を加え、ホモジナイズして活性を測定したが、このような抑制は認められなかった。それ故、肝 Ch E 活性の減少は、水銀化合物の阻害によるものではなく、肝からの Ch E 逸脱による可能性が強い。一方、アリルエステラーゼは活性部位にシステインを有する SH 酵素と考えられているが、²²⁾ 実際、水銀化合物の Ch E に対する抑制濃度よりも、低濃度で阻害が認められ、*in vivo* における肝アリルエステラーゼ活性の減少は、水銀化合物の阻害によることを示している (Table III)。

各種血清酵素活性の変動

EMC, MEMC 10 mg Hg/kg を腹腔内投与後、120 時間までの血清 ChE 活性を Fig. 3 に示した。両投与群とも活性は増加し、投与後 48 時間にピークを示し、以後減

Fig. 3. Cholinesterase Activity in Serum of Mice injected intraperitoneally with EMC and MEMC (10 mg Hg/kg)

Data for each point were obtained from the mean of samples from 4 to 5 mice.

—○—: EMC —△—: MEMC

TABLE III. Effect of Varying Concentrations of Mercury Compounds on the Activity of Liver and Plasma Arylesterase Activity

Concentration (M)	Liver (% activity)			Plasma (% activity)		
	MC	MEMC	EMC	MC	MEMC	EMC
1.6×10^{-3}	—	83.8	61.2	—	64.9	—
1.0×10^{-4}	40.6	89.4	66.3	8.8	95.1	87.8
5.0×10^{-5}	48.5	—	—	60.5	—	91.7
1.0×10^{-5}	90.1	104.6	82.0	96.1	95.1	97.1
1.0×10^{-6}	90.3	110.0	99.6	103.4	101.5	98.5
1.0×10^{-7}	99.4	103.0	100.9	107.3	99.5	103.9

22) K.B. Augustinsson, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **94**, 844 (1961).

Fig. 4. Activity of Some Enzymes in Serum of Mice injected intraperitoneally with EMC and MEMC

Data for each point were obtained from the mean in pools of 2 mice sera (each group of 6 mice).

a) GOT b) GPT c) LDH d) β -G e) ALP
 —○—: EMC, 10 mgHg/kg —●—: EMC, 5 mgHg/kg
 —△—: MEMC, 10 mgHg/kg —▲—: MEMC, 5 mgHg/kg

Table IV. Cholinesterase Activity in Liver Homogenate of Mice 72 hr after the Intraperitoneal Injection of EMC and MEMC (10 mg Hg/kg)

Treatment	Homogenate 10 ⁻⁸ mole/mg protein/min (%)	Microsome 10 ⁻⁹ mole/mg protein/min (%)	Soluble 10 ⁻⁹ mole/mg protein/min (%)
Control (5) ^{a)}	6.18±0.33 (100)	17.7±0.11 (100)	0.92±0.03 (100)
EMC (5) ^{a)}	5.95±0.76 (96)	14.9±0.18 (84)	1.06±0.06 (115)
MEMC (4) ^{a)}	6.29±1.10 (101)	15.9±0.29 (90)	1.31±0.09 (143)

a) The number of animals. The values represent the mean ± SE.

少し、対照群の活性にほぼ回復した。

このような有機水銀化合物による血清酵素活性の増加が肝から流出したことによるのか、更に ChE に特異的な現象であるのかどうかについて検討するため、しばしば障害肝から血清中へ流出する諸酵素の中、5種類について活性を測定した (Fig. 4)。投与量 10 mg Hg/kg で GOT, GPT, LDH, β -G 活性は有意に増加し、更に最高活性は EMC 投与群では 48 時間後、MEMC 投与群では 24 時間後に出現した。一方、ALP は活性の抑制が認

められた。

従って、血清酵素活性の増加は、ChE に特異的であるのではなく、他酵素にも起こり、血清における各種酵素活性の増加は肝障害による非特異的な現象と考えられる。

肝細胞内の ChE 活性の変動

EMC および MEMC 投与 72 時間後の肝細胞分画の ChE 活性を Table IV に示した。肝における pseudo-ChE は microsome 画分に、true-ChE は plasma membrane に結合して存在すると報告されている。²³⁾ 両投与

23) G.E. Wheeler, R. Coleman, J.B. Finean, *Biochim. Biophys. Acta*, **255**, 917 (1972).

群のホモジネートの Ch E 活性は対照群とほとんど差がないが, microsome 画分の活性は減少し, 可溶画分に増加が認められ, これは Ch E の肝 microsome から可溶画分への移行を示していると考えられる.

考 察

血清 Ch E は種々の病態において低下するが, 肝疾患時においても低値を示す.²⁴⁾ 肝硬変症の如き重症肝疾患における血清アルブミン量の減少と平行した血清 Ch E 活性の低下は, アルブミンの肝における合成にともない Ch E 合成も行なわれていると考えられ, 肝障害時の血清 Ch E 活性の低下は, 血清 Ch E の起源を肝に求める根拠になっている. 又, ネフローゼ症候群においては血清 Ch E 活性が増加するが, これは, 血清アルブミンが尿中に喪失されることにより肝アルブミン合成が促進され, それに伴い肝 Ch E 合成も増加するためと解釈されている. しかし無アルブミン血症の血清 Ch E 活性は正常値を示すという反論もある.²⁵⁾ Rat 血清および肝 Ch E 活性は絶食や蛋白欠乏食飼育により低下するが, 更に肝毒性薬物である四塩化炭素処置により低下し, これは肝における酵素合成の抑制によると考えられている.²⁶⁾

有機水銀化合物連続投与によりマウス血漿 Ch E 活性が増加することを示したが, 同時に肝内 Ch E 活性は減少をきたし, 又, *in vitro* の結果より, 本実験条件下での組織中水銀濃度が, 血漿および肝 Ch E 活性に影響を与えることは考え難いことから, 有機水銀による血漿 Ch E 活性の増加は肝からの Ch E 逸脱に起因していることが示唆される.

市原ら²⁷⁾ は, ラット肝浮遊細胞を用いて可溶画分の酵

素浮は細胞膜透過性の増大により漏出を起こし易いことを報告している. 細胞内顆粒に存在又は結合して存在するとされている酵素についても障害肝からの逸脱が報告されている.²⁸⁾ 本実験における血清 GOT, GPT, LDH, β -G 活性の上昇は, 肝逸脱に基づいている可能性を示している. また, 1 回投与72時間後の肝における Ch E 活性は microsome 画分から可溶画分への移行による細胞内障害を示した (Table IV). これらの事から, 有機水銀化合物の作用として細胞内の機能の乱れ, 或いは膜透過性の増大を生起することによる細胞障害を有することが示唆される. Norseth²⁹⁾ は MC をラットに投与し, Hg^{2+} は肝細胞の lysosome に遊動的に蓄積することを指摘し続いて加水分解酵素が遊離することにより細胞毒性の原因となることを示唆した. 又, 未変化の有機水銀は, 主に microsome に蓄積するが, lysosome における水銀の蓄積は, 有機水銀化合物の生体内での安定性が反映されることを報告している.³⁰⁾

このような顆粒への水銀の蓄積性と水銀化合物による臓器中への蓄積の難易さを考慮すると, MEMC より肝蓄積が高い EMC の方が細胞顆粒への水銀の蓄積が高くなり, 毒性作用が強く現われることが推察されるが, これは血清又は血漿酵素活性増加についての本実験結果と一致する.

謝辞 本研究を行なうにあたり, 多くの御助言を戴いた国立衛生試験所食品部長, 内山 充博士, 東京理科大学薬学部, 中井 正教授に深く感謝します. 又, 貴重な阻害剤 (62C47) を供与戴いた東京薬科大学, 土屋晴嗣助教授に感謝します.

- 24) L.J. Vorhaus, R.M. Kark, *Am. J. Med.*, **14**, 707 (1953).
- 25) A.A. Dietz, H.M. Rubinstein, T. Lubrano, *Clin. Chem.*, **12**, 25 (1966).
- 26) R.W. Brauer, M.A. Root, *J. Pharmacol.*, **88**, 109 (1946); S. Ellis, S. Sanders, O. Bodansky, *ibid.*, **91**, 255 (1947).
- 27) 市原 明, 谷岡博昭, 井上秀夫, 竹田美朗, 医化学シンポジウム, **2**, 177 (1962).
- 28) S.P. Bhatnagar, *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2009 (1970); C.H. Williams, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **14**, 283 (1969).
- 29) T. Norseth, *Biochem. Pharmacol.*, **16**, 1645 (1967).
- 30) T. Norseth, *Biochem. Pharmacol.*, **17**, 581 (1968); T. Norseth, M. Brendeford, *ibid.*, **20**, 1101 (1971).