水銀化合物の環境衛生学的研究 (第4報¹⁾)
ヒト胎盤における水銀結合蛋白質について²⁾

三谷一憲, 中田利一,^{3a)} 小瀬洋喜^{3b)}
名古屋市衛生研究所,^{3a)} 岐阜薬科大学^{3b)}

Environmental Hygienic Studies on Mercury Compounds. IV.¹⁾
Mercury-binding Proteins in Human Placenta²⁾

KAZUNORI MITANI, TOSHIKAZU NAKATA^{3a)}
and YOKI OSE^{3b)}
Nagoya City Health Research Institute^{3a)}
and Gifu College of Pharmacy^{3b)}

(Received May 23, 1977)

In order to study the placental transfer of mercury compounds (methylmercury and inorganic mercury), mercury-binding proteins in human placenta were examined by comparing with proteins binding with Zn, Cu, Cd, or Se, and the following results were obtained.

1) The human placenta supernatants were fractionated by Sephadex G-75 column. Zn was mainly bound to high molecular weight (mol. wt.) proteins, but Cu was observed in several mol. wt. ranges. Se was bound both to high and low mol. wt. proteins. Cd was primarily found in low mol. wt. fractions (metallothionein) with only a minute amount in high mol. wt. fractions.

Zn and Cu concentration in umbilical cord blood was lower than that in maternal blood.

2) Inorganic mercury was bound both to high (void volume to 40000) and low (about 1100, metallothionein-like protein) mol. wt. proteins. Methylmercury bound to high mol. wt. proteins (void volume to 40000), but components of low mol. wt. (only a few thousands) were also observed. It was noted that methylmercury-binding proteins were different from inorganicmercury-binding proteins and, therefore, it was suggested that methylmercury compounds were more transferable across the placenta than inorganic mercury compounds.

Keywords—placental transfer of mercury compounds; human placenta supernatants; Sephadex G-75 column; mercury-binding proteins; zinc-binding proteins; copper-binding proteins; cadmium-binding proteins; selenium-binding proteins; metallothionein

緒 言

前報^{1,4)}では名古屋市内在住の一般産婦89名について、分娩時の母体の血液、毛髪、尿、母乳、胎盤および胎児の臍帯血、臍帯に含まれる水銀量を測定し、水銀化合物の胎盤透過と胎児への移行、蓄積について検討した。そ

の結果、水銀化合物のうちメチル水銀は容易に胎盤を透過するが、無機水銀は透過しにくく大部分は胎盤に蓄積すると考えられ、母体に摂取された水銀化合物の量に比例して胎児へ移行することが一般母体についても明らかに認められた。

1) 第3報: 三谷一憲, 星野道雄, 児玉京子, 近藤正人, 小瀬洋喜, 衛生化学, **22**, 333 (1976).

2) 日本薬学会第97年会, 東京, 1977年4月で要旨講演.

3) Location: a) 1-11 Hagiya-cho, Mizuho-ku, Nagoya (名古屋市瑞穂区萩山町1-11); b) 5-6-1, Mitahora Higashi, Gifu (岐阜市三田洞東5-6-1).

4) 三谷一憲, 星野道雄, 児玉京子, 近藤正人, 小瀬洋喜, 衛生化学, **22**, 327 (1976).

本報は水銀化合物の化学形（メチル水銀と無機水銀）により胎盤透過性の異なる理由を明らかにする目的で、ヒト胎盤における水銀結合蛋白質について検討した。また、Zn, Cu, Cd, Se など、水銀と関係ある金属との結合蛋白質の検討を併せて行ない知見を得たので報告する。

実験方法

1. 試料 某産婦人科で出産した名古屋市内在住の健康な産婦の胎盤を用いた。試料を提供したいずれの産婦も医師による産前、産後の診断では異常は認められず、また出生した児にも全く異常は認められなかった。

胎盤は出産後直ちに -20° のフリーザーに保存し、できるだけすみやかに実験室へ持ち帰り、解凍後実験に供した。

2. 上清分画のゲルろ過 羊膜部分を除いた胎盤試料は Hogeboom⁵⁾ の方法に準じて 2 倍量の 0.25 M ショ糖液を加え Potter-Elvehjem Homogenizer を用い、氷水中でホモジェナイズした。ホモジェネートは $105000 \times g$, 60分 (4°) で遠心分離し、上清を Sephadex G-75 カラム (1.8×74 cm) に添加し、室温 4° , 0.01 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.0) で溶出させた。溶出液は約 5 g ずつのフラクションに捕集した。

各フラクションは、まず蛋白質の紫外 (UV) 吸収を測定し、その後、Zn, Cu, Cd, Se をフレイムレス原子吸光 (カーボンロットアトマイザー) で定量し、最後に水銀の分別定量を行なった。

3. 蛋白質の測定および分子量の決定 分光光度計 (日立139型) を用い、250, 280 nm の UV 吸収を測定した。蛋白質の UV 測定では核酸等の影響が考えられるので Lowry 法による比色定量⁶⁾ も行なった。

蛋白質の分子量決定⁷⁾ は標準物質に Cytochrome C (分子量, 12270), RNase (分子量, 14000) および

Ovalbumin (分子量, 45000) を用い、同一カラムで V_e/V_o ⁸⁾ と log mol. wt. の関係の検量線を求め、それより各フラクションごとの大体の分子量を求めた。

4. 上清分画のゲルろ過後の各フラクション中の金属含有量 1) Zn, Cu, Cd および Se の定量—Pulido ら⁹⁾ はヒト腎から metallothionein を単離し、その中に Zn, Cu, Cd, Hg が多く含まれるとし、また Ganther ら¹⁰⁾ はマグロ体内のメチル水銀量と Se 量との間に正相関があると報告している。そこで水銀と何らかの関係がある Zn, Cu, Cd および Se をカーボンロットアトマイザーによる フレイムレス 原子吸光分析装置 (Nippon Jarrel Ash AA-I, FL-10型) で定量した。その条件を Table I に示す。

表中 Zn の波長 (Wevelength) 307.6 は Zn の 2 次共鳴線であり試料が高濃度の場合用いた。測定値は 3 回測定 の平均値であり D_2 補正した値である。

2) 水銀の分別定量—試料中の水銀は総水銀(TM), メチル水銀(MM), 無機水銀(M)に分別して求めた。¹¹⁾ その方法は 著者がすでに報告した方法¹²⁾ を応用したものであり Chart 1 に示す。この場合、各フラクションごとでは試料が少ないため 2 つのフラクションを混合したものを 1 試料とした。¹³⁾

試料中の水銀は蛋白質と結合していると考えられ、その切断のため HCl を加え最終的に 2 N となるようにした。

メチル水銀量は総水銀量と無機水銀量の差から求め、それぞれ測定値はすべて Hg 量として表現した。

5. 母体血、胎盤、臍帯血中の Hg, Zn, Cu, Cd および Se の定量 ゲルろ過に供した試料を含め 10 例について母体血 (全血), 胎盤, 臍帯血 (全血) 中の Hg, Zn, Cu, Cd および Se の含有量を測定し、各金属の胎盤透過の傾向をみた。¹⁴⁾

- 5) G. H. Hogeboom, "Method in Enzymology," Vol. 1, edited by S. P. Colowick, N. O. Kaplan, New York, 1955, p. 16.
- 6) 福島正美, 菅原 潔, "蛋白質の定量法," 東京大学出版会, 東京, 1971, p. 89.
- 7) a) P. Andrews, *Biochem. J.*, **96**, 595 (1965); b) J. M. Wiśniewska, B. Trojanowska, J. Piotrowski, M. Jakubowski, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **16**, 754 (1970).
- 8) V_e : elution volume, V_o : void volume.
- 9) P. Pulido, J. H. R. Kägi, B. L. Vallee, *Biochemistry.*, **5**, 1768 (1966).
- 10) H. E. Ganther, C. Gondie, M. L. Sunde, M. J. Kopecky, P. Wagner, Sang-Hwan OH, W. G. Hoekstra, *Science*, **175**, 1122 (1972); J. H. Koeman, W. H. M. Peeters, C. H. M. Koudstaal-Hol, P. S. Tjioe, J. J. M. Goeig, *Nature (London)*, **245**, 385 (1973); L: Kosta, A. R. Byrne, V. Zelenko, *Nature (London)*, **254**, 238 (1975).
- 11) ここでのメチル水銀 (MM), 無機水銀 (M) とは蛋白質との結合が切断された後の水銀の化学形がそれぞれメチル水銀, 無機水銀であるものをさす。
- 12) 三谷一憲, 衛生化学, **22**, 65 (1976).
- 13) フラクション 1, 2, フラクション 3, 4, ……といったふうに混合し, それぞれ 1 試料とする。
- 14) 星野道雄, 三谷一憲, 児玉京子, 中田利一, 八神喜昭, 近藤東洋夫, 日本薬学会第 97 年会講演要旨集, 第三分冊, p. 121.

TABLE I. Conditions for the Determination of Cu, Zn, Cd and Se by Flameless Atomic Absorption Spectroscopy using a Carbon Tube Atomizer

Metals	Wavelength (nm)	Dry		Ash		Atomize	
		Current (A)	Time (sec)	Current (A)	Time (sec)	Current (A)	Time (sec)
Cu	324.7	20	10	45	30	210	10
Zn	213.9 (307.6)	20	10	45	30	200	10
Cd	228.8	20	10	45	30	180	10
Se	196.0	20	10	45	30	220	10

Injected volume: 10 μ l.

Chart 1. Analytical Procedure of Total Mercury (TM) and Inorganic Mercury (M)

Hg——総水銀，メチル水銀，無機水銀を前報⁴⁾と同様の方法で定量した。

Zn, Cu—— HNO_3 - HClO_4 で湿式灰化後，直接フレイム原子吸光分析。¹⁵⁾

Cd—— HNO_3 - HClO_4 で湿式灰化後，DDTC-MIBK 抽出し，フレイム原子吸光分析。

Se—— HNO_3 - HClO_4 で湿式灰化後，2,3-diaminonaphthalene による蛍光分析。¹⁶⁾

実験結果

1. ヒト胎盤上清分画のゲルろ過

1) 蛋白質の分布 ヒト胎盤上清分画の蛋白質の UV 吸収および Lowry 法による定量結果を Fig. 1 に示す。

表中の近似分子量 (approximate molecular weight) は前述方法 3 での検量線から求めたものである。

280 nm の吸収パターンは高分子量域に 1 つの大き

なピークと低分子量域に 2 つの小さいピークをもち，Lowry 法による蛋白質量とほぼ一致した。250 nm の吸収は 280 nm の吸収とほぼ同じ傾向を示したが，分子量約 11000 のフラクション No. 21 では 250 nm の吸収が 280 nm の吸収より高く，Wiśniewska ら^{7a)} のいう metallothionein の性質と一致していた。

2) Zn, Cu, Cd および Se の分布 ゲルろ過による各フラクション中の Zn, Cu, Cd および Se の濃度を定量し，その分布を Fig. 2 に示す。

Zn は高分子量域にほとんど分布しており，分子量約 11000 の分画 (フラクション No. 21) と 4000—3000 の低分子量域にわずかにピークが認められた。

Cu の分布は高分子量域から低分子量域にかけて徐々に減少するパターンを示した。

Se は高分子量域と低分子量域 (分子量 1600 前後) にピークがあり，分子量約 11000 の分画にはほとんど検出

15) 地方衛生研究所環境保健部会，東海，北陸，近畿ブロックの 8 衛研間で生体試料中の Zn, Cu 等についてクロスチェックを行なったところ，著者らの方法と灰化後 APDC あるいは DDTC-MIBK 抽出し，原子吸光分析した方法による結果では差異を認めなかった。

16) 日本薬学会，衛生化学，20，A-1 (1974)。

Fig. 1. UV-absorption of the Fractions at 250 and 280 nm and Protein Concentration by Lowry Method

○—○: 250 nm, ●—●: 280 nm, △—△: protein.
1 fraction = 5 g, column: Sephadex G 75, 1.8×74 cm.

Fig. 3. Distribution of Mercury among Human Placenta Supernatant

●—●: total mercury, ○—○: inorganic mercury.
△—△: methylmercury. 1 fraction = 5 g.
column: Sephadex G 75, 1.8×74 cm.

Fig. 2. Distribution of Zn, Cu, Se and Cd among Human Placenta Supernatant

1 fraction = 5 g, column: Sephadex G 75, 1.8×74 cm.

されなかった。

Cdはフラクシオン No. 21 に大きなピークがあり、この結合蛋白質は metallothionein と思われる。Cd のもう1つの結合は高分子量域に認められた。

3) Hg の分布 各フラクシオン中の水銀をメチル水銀、無機水銀に分別定量し、その分布を Fig. 3 に示す。

無機水銀、メチル水銀ともその分布に2つのピークが認められ、その1つは両者とも高分子量域にあった。無機水銀の場合、他の1つのピークは分子量1万前後の分画に認められた。

メチル水銀では分子量1万前後にピークはなく、もう1つのピークはさらに低分子量のフラクシオン (フラクシオン No. 33, 34) に認められた。このピークは先の Se の低分子量域のピークと溶出位置がほぼ一致していた。

このようにメチル水銀と無機水銀では結合する蛋白質に明らかな差が認められた。

胎盤の上清分画のゲルろ過を他の3例の産婦の胎盤について行なった結果、蛋白質の UV 吸収および Zn, Cu, Cd, Se および Hg ともそれぞれの試料による各金属の濃度差は多少あったが、全体的な分布のパターンには試料間の差はほとんど認められなかった。

2. 母体血, 胎盤 および 臍帯血中の Hg, Zn, Cu, Cd, Se の含有量

ゲルろ過を行なった試料を含め 10 例について, 母体血, 胎盤および臍帯血中の Hg, Zn, Cu, Cd, Se の含有量を求め, それぞれの金属の胎盤透過—胎児移行を検討した. 各金属について臓器 (試料) 別の濃度をそれぞれ平均値 (最高値—最低値) で示したのが Fig. 4 である.

Fig. 4. The Distributions of Metal Contents among the Maternal Blood, Placenta and Umbilical Cord Blood

Sample number: 10.

hatched: maternal blood.

white: placenta.

dotted: umbilical cord blood.

⊥ maximum.

⊥ average.

⊥ minimum.

a) TM: total mercury. b) MM: methylmercury.

c) M: inorganic mercury (M=TM+MM).

1) Hg について メチル水銀, 無機水銀の母体血, 胎盤, 臍帯血中濃度は平均値でそれぞれ 1.1, 0.8; 1.9, 8.6; 1.8, 1.0 $\mu\text{g Hg}/100\text{g}$ であった. この値は前報¹⁴⁾ とほぼ同様であり, 前報でのべたようにメチル水銀と比べて無機水銀は胎盤に蓄積しやすく, 化合物の形の違いにより胎盤の透過性に差が認められた.

2) Zn, Cu, Cd および Se について Zn の胎盤

中濃度は母体血中よりやや高いが, ほぼ同じレベルにあり, 臍帯血中濃度は母体血中濃度の 1/3 以下であった.

Cu 濃度は胎盤中濃度と臍帯血中濃度がほぼ同じレベルにあり, 母体血中濃度の 1/2 以下であった. 母体血中 Cu 濃度が胎盤, 臍帯血中に比較して非常に高い. これは妊婦では血清中 Cu 量が増加し, 分娩時には平常の 2 倍強になるといわれ,¹⁷⁾ 血液試料は分娩時に採取したものであり, 全血中 Cu 量も高値を示したものと思われる.

妊娠, 分娩による母体血中の金属濃度の変動については Cu の他に, 妊婦の血中 Zn 量が正常人よりやや低いという報告¹⁸⁾があるが, その他の金属については報告はみられなかった.

Cd については臍帯血中濃度と母体血中濃度はほぼ同じレベルにあり, 胎盤中濃度の約 1/3 程度であった.

Se は母体血, 胎盤, 臍帯血中濃度にほとんど差は認められなかった.

考 察

著者らは先に水銀の胎児への移行蓄積をヒト胎盤について検討し, メチル水銀は容易に胎盤を透過するが, 無機水銀は透過しにくく大部分は胎盤に蓄積することを認め報告した.

本報では胎盤上清分画の Sephadex G-75 ゲルろ過により, メチル水銀と無機水銀では結合する蛋白質が異なること, 無機水銀は蛋白分子量 1 万前後の分画に一部結合しており, これはいわゆる Nordberg¹⁹⁾ Norheim²⁰⁾のいう metallothionein like protein 分画であることを認めた.

倉山²¹⁾は CH_3HgCl および HgCl_2 をマウスに投与し, 肝上清分画の水銀結合蛋白質をゲルろ過で調べた結果, CH_3HgCl と HgCl_2 では, その結合する蛋白質が異なるとし, 著者らの胎盤中の分布と一致する結果を報告している. また Chen²²⁾は CH_3HgCl をウズラに投与し, 肝上清分画について実験し, 同様の結果を得ている.

一方 Chen²²⁾は CH_3HgCl と thionein の親和性を

- 17) A. L. Nielsen, *Acta Med. Scand.*, **118**, 87 (1944); J. A. Halsted, B. Hackley, T. C. Smith, *Lancet.*, **2**, 278 (1968).
- 18) B. L. Vallee, J. G. Gibson, *J. Biol. Chem.*, **176**, 445 (1948); A. S. Prasad, D. Oberleas, J. A. Halsted, *J. Lab. Clin. Med.*, **66**, 508 (1965); J. A. Halsted, B. Hackley, J. C. Smith, *Lancet.*, **2**, 278 (1968).
- 19) M. Nordberg, B. Trojanowska, G. F. Nordberg, *Environ. Physiol. Biochem.*, **4**, 149 (1974).
- 20) G. Norheim, E. Steinnes, *Acta Pharmacol. et Toxicol.*, **38**, 137 (1976).
- 21) 倉山令子, 中村 功, 滝沢行雄, *日衛誌*, **31**, 393 (1976); 倉山令子, 滝沢行雄, 中村 功, *日衛誌*, **31**, 58 (1976).
- 22) R. W. Chen, H. E. Ganther, W. G. Hoekstra, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **51**, 383 (1973).

in vitro で検討し, Hg^{2+} , Cd^{2+} と異なり, 親和性はほとんどなかったとし, メチル水銀の体内分布や解毒に metallothionein は関与していないと推論している.

以上のようにヒト胎盤中において水銀化合物は化合物の形(メチル水銀と無機水銀)の違いにより結合する蛋白質が異なっており, 無機水銀は Hg-thionein を形成して胎盤中に蓄積するが, メチル水銀は thionein を形成しないと考えられる. こうした性質が胎盤におけるメチル水銀と無機水銀の透過性, 蓄積性の違いを示唆していると考えられる.

またヒト胎盤において, 蛋白分子量1万前後の分画に Hg の他にも Cd, Zn のピークを認めた.

Metallothionein については多くの研究がなされ, すでにいくつかの優れた総説²³⁾もある. しかし, 従来の研究はマウス, ラットなどについての動物実験が主であった. ヒト臓器について Hg, Cd を含め種々の金属の結合蛋白質を研究した報告は少なく, ただ Norheim ら²⁰⁾の交通事故で死亡したヒト肝についての報告がみられる.

著者らがヒト胎盤の上清分画をゲルろ過し, 蛋白質と金属の分布をみた結果を Norheim らがヒト肝について行なった結果と比較すると, 両者の結果は蛋白質の UV 吸収パターン, Hg, Zn, Cu, Cd, Se 各金属分布とも非常に類似していた.

Norheim らは放射化分析で金属量を測定しているため Hg は総水銀(TM)として測定されているので著者らの総水銀の結果と比較すると, 分子量1万前後の分画(Nordberg ら, Norheim らのいう metallothionein like protein と同一と思われる.)の水銀量とそれぞれの高分子量蛋白質と結合した水銀量との割合において Norheim らの肝臓中の方が著者らの胎盤中より前者の割合が非常に多かった.

Lucis ら²⁴⁾はラットに ^{109}Cd と ^{65}Zn を投与し, 肝臓および胎盤の上清を Sephadex G-75 でゲルろ過し, 肝, 胎盤とも高分子量分画と metallothionein 分画にそれぞれ ^{109}Cd , ^{65}Zn を認めている.

田中ら²⁵⁾は Cd-thionein は肝で合成され, 腎へ移動す

ることをラットを用いて示したが, 著者らの結果はヒトにおいても肝で合成されて胎盤へ移動することを推定させるものである. ただし, 組織培養されたヒト肺臓由来の embryonic fibroblast cell, HeLa cell およびサル腎 epithelial cell などに ^{109}Cd を与えると, カドミウム結合蛋白質(おそらく metallothionein)が生成されたという報告²⁶⁾やブタ腎細胞を用いての実験,²⁷⁾および human skin epithelial cells を培養して Cd による metallothionein の生成が確認されたとする報告²⁸⁾があるように肝以外の臓器でも生合成されるので胎盤で生成されるとも考えられる.

金属の種類および化合物の形の違いによる胎盤透過性を検討するため, 母体血, 胎盤, 臍帯血中の Hg (メチル水銀と無機水銀), Zn, Cu, Cd および Se を測定した. それぞれの金属について試料間の濃度差を比較すると, 胎盤中濃度の割合が最も高いのは無機水銀であり, Cd も同様の傾向を示している. メチル水銀は胎盤中濃度と臍帯血中濃度がほぼ同じレベルにあり, 胎盤透過性を示しているが, Se も同様の傾向を示している. Zn は胎盤中に比して臍帯血中濃度は減少しているが, Cu についても両者の濃度差は Zn ほどではないが臍帯血中濃度が胎盤中濃度よりやや低かった.

臍帯血中濃度と比し胎盤中濃度が高い金属, すなわち胎盤に蓄積しやすい金属は metallothionein を形成する金属であり, metallothionein を形成しないメチル水銀および Se は胎盤を透過しやすい金属であることが認められた.

総 括

1. ヒト胎盤上清分画を Sephadex G-75 カラムでゲルろ過した結果, 無機水銀は蛋白分子量1万前後の分画に結合がみられ, これは Nordberg ら, Norheim らのいう metallothionein like protein であると思われた.

一方, メチル水銀はこの分画には認められずさらに低分子量の分画にあった.

メチル水銀と無機水銀では結合蛋白質に差異が認められ, 胎盤におけるメチル水銀と無機水銀の透過性, 蓄積性の違いが示唆された.

- 23) 不破敬一郎, 科学, **41**, 569 (1971); 山崎素直, 不破敬一郎, 総合臨床, **23**, 56 (1974); 木村正己, 医学のあゆみ, **83**, 1 (1972); 木村正己, 代謝, **12**, 205 (1975); 木村正己, ファルマシア, **13**, 210 (1977); 小野 哲, 医学のあゆみ, **96**, 453 (1975).
- 24) O. J. Lucis, R. Lucis, Z. A. Shakh, Arch. Environ. Health., **25**, 14 (1972).
- 25) 田中慶一, 末田香里, 岡原国男, 衛生化学, **20**, 98 (1974).
- 26) O. J. Lucis, Z. A. Shaikh, J. A. Embil, Experientia., **26**, 1109 (1970).
- 27) M. Webb, M. Daniel, Chem. Biol. Interaction., **10**, 269 (1975).
- 28) T. Norseth, H. E. Rugstad, Nature (London), **257**, 136 (1975).

2. Zn, Cu, Cd および Se についても 結合する蛋白質の分布は金属により異なっており, 各金属の胎盤中濃度と臍帯血中濃度から, metallothionein を形成する金属は臍帯血中に比し胎盤中濃度が高く, metallothionein を形成しない金属は両者の濃度差はほとんどなく胎盤透

過性のあることを示す結果が得られた.

謝辞 本研究に際しご協力下さいました名古屋市立大学医学部産婦人科学教室 八神喜昭教授, 近藤東洋夫助手に厚くお礼申し上げます.