〔衛 生 化 学〕
EISEI KAGAKU
24 (5) 246-251 (1978)

水銀化合物の環境衛生学的研究 (第6報¹⁾)

妊娠ラットにおける水銀化合物の胎盤透過, 胎仔移行におよぼすシステインの影響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. VI.¹⁾

The Effect of Cysteine on the Transfer of Mercury Compounds to Fetus across the Placenta in Pregnant Rats²⁾

KAZUNORI MITANI, TOSHIKAZU NAKATA^{3a)}

and YUKI OSE^{3b)}

Nagoya City Health Research Institute^{3a)}

and Gifu College of Pharmacy^{3b)}

(Received May 13, 1978)

Effect of cysteine on the transfer of mercury (methylmercury and inorganic mercury) compounds to fetus across the placenta was examined in pregnant rats.

Either of 4 kinds of mercury solutions, methylmercury solution (MM), MM added with cysteine solution (MM-cys), inorganic mercury (HgCl_2) solution, and HgCl_2 added with cysteine solution (HgCl_2 -cys), was injected intravenously into pregnant rats at 18 th day of gestation. After 2 hr, they were killed by blood letting from femoral vein and mercury concentration in blood, liver, kidneys, brain, placenta, and fetus was determined. In both placental and fetal mercury, MM-cys group showed significantly higher content than MM group but there was no difference between HgCl_2 -cys group and HgCl_2 group. The ratio of fetal to placental mercury content in MM-cys group was significantly higher than that in MM group.

These facts indicate that cysteine was one of the materials which promoted the transfer of methylmercury to fetus across the placenta.

Keywords—placental transfer of mercury compounds; methylmercury; inorganic mercury; cysteine; dialysis; pregnant rat

緒 言

著者らは水銀化合物のうち, メチル水銀 (以下 MM と略す) は容易に胎盤を透過するが, 無機水銀 (以下 M と略す) は透過しにくく, 大部分は胎盤に蓄積することを一般母体について認め,^{4a, b)} MM と M の胎盤透過・蓄

積性の差を明らかにするため, ヒト胎盤のホモジェネート上清について水銀結合蛋白質の分布^{4c)} および胎盤中の M の蓄積部位を組織化学的¹⁾ に検討してきた。

MM の胎盤透過は胎児性水俣病の発病機作解明に重要な意義をもつものであるが, MM の胎盤透過機構に

1) 第5報: 三谷一憲, 中田利一, 小瀬洋喜, 衛生化学, **24**, 102 (1978).

2) 日本薬学会第98年会, 岡山, 1978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) a) 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); b) 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); c) 三谷一憲, 中田利一, 小瀬洋喜, 衛生化学, **23**, 352 (1977).

についての知見はない。

Sugawa⁵⁾はアミノ酸が胎盤から胎児へ能動輸送されることを示し、松本⁶⁾、高橋⁷⁾はシステインがMMの腸管透過性および脳移行性を高めることを報告している。著者らは、これらの事実にもとづき、MMの胎盤透過、胎仔移行におよぼすシステインの影響を明らかにするため、妊娠ラットを用い本研究を行い、知見を得たので報告する。

実験方法

1. 実験動物 ウィスター系の雌、雄成熟ラットを1匹ずつ同居させ交尾させた。妊娠18日後の雌ラット(体重約250g)を各群2—3匹ずつ編成した。透析実験用の血液試料は雄ラット(体重200g)から得た。

2. 投与試料溶液^{8,9)} ①MM: CH_3HgCl 水溶液 ②MM-cys($\times 10$): MMにシステイン($\text{HS}\cdot\text{CH}_2\cdot\text{CH}\cdot\text{NH}_2\cdot\text{COOH}$)を添加し、システイン濃度を水銀濃度の10倍モル濃度とした溶液 ③MM-cys($\times 1$): システイン濃度と水銀濃度が等モル濃度の水溶液 ④MM-cys($\times 0.5$): システイン濃度を水銀濃度の0.5倍モル濃度とした溶液 ⑤M: HgCl_2 水溶液 ⑥M-cys($\times 10$): Mにシステインを添加し、システイン濃度を水銀濃度の10倍モル濃度とした溶液 ⑦cys($\times 10$): 投与水銀水溶液の10倍モル濃度のシステイン水溶液 ⑧cys($\times 100$): 投与水銀水溶液の100倍モル濃度のシステイン水溶液。

試料溶液の水銀濃度は①と②がそれぞれ1mg/ml, 0.5mg/ml, ③は0.5mg/mlおよび0.2mg/mlであり、④は0.5mg/ml, ⑤と⑥は1mg/mlであった。

3. 透析実験用の血液試料 投与試料溶液③(0.2mg/ml)をウィスター系雄ラット(体重200g)の胃内へゾンデで2ml投与し、2時間後に採血した。その血液の一定量に同量の蒸留水を加えて溶液させた。その一部についてMM含有量を定量した結果、5 $\mu\text{g/ml}$ であった。MM濃度が1 $\mu\text{g/ml}$ (約5 μM)となるように、リン酸緩衝液(pH 7.4)を加えて希釈し試料とした。

4. 2)の実験で投与試料溶液①および③を投与して得られた血液も同様に最終MM濃度が1 $\mu\text{g/ml}$ となるように希釈し透析用の試料とした。

4. 実験 1) 妊娠ラットを各群3匹ずつ6群を編

成し、ラットの体重当りの水銀投与量が投与試料溶液①, ②は2mg/kgおよび1mg/kgとなるように、投与試料溶液⑤, ⑥は2mg/kgとなるように、各濃度の溶液をそれぞれ尾静脈内へ注射し(約0.5ml), 2時間後の各臓器中の水銀濃度を測定した。

2) 妊娠ラットを各群2匹ずつ4群に編成し、これらにそれぞれ投与試料溶液①—④を水銀量として1mg/kgとなるように尾静脈内へ注射し(約0.5ml), 2時間後の胎盤および胎仔中の水銀量を測定した。

3) 妊娠ラットを各群2匹ずつ5群に編成し、投与試料溶液①を水銀量として1mg/kgとなるように尾静脈投与(約0.5ml)する。この10分前および10分後に投与試料溶液⑦および⑧をそれぞれ尾静脈内へ投与(約0.5ml)する。以下、本文中ではシステインを前投与した群をcys($\times 10$)+MMおよびcys($\times 100$)+MM, 後投与した群をMM+cys($\times 10$)およびMM+cys($\times 100$)と表現する。各群ともMM投与2時間後の胎盤および胎仔中の水銀量を測定した。

4) 透析膜はCellulose Tubing 薄手 20/32 (Visking社製)を袋状にして試験管に入れ、内液に3. で得た血液試料2ml, 外液に0, 5—1000 μM 濃度のシステインを含むリン酸緩衝液(pH 7.4)5mlを入れ、37°で48時間透析した。透析後、内液および外液中の水銀量を測定した。

5. 水銀の測定法 実験に供したラットは大腿部血管しや血によりと殺し、血液はヘパリンを添加した試験管に採取した。胎盤および胎仔はそれぞれを対にし、各々1試料ずつ水銀量を定量した。定量方法は血液および透析実験の内液、外液はそのまま、各臓器はハサミで細切後、前報^{4a)}と同様の方法で行なった。

結果および考察

1. 水銀化合物の胎盤を透過し胎仔への移行・蓄積におよぼすシステインの影響

1) 水銀化合物の臓器別分布 MM, MM-cys($\times 10$), M および M-cys($\times 10$)の4種類の水銀化合物水溶液を血管内へ投与したとき、2時間後の各臓器中濃度をTable Iに示す。

5) T. Sugawa, S. Yamanaka, M. Ozaki, *J. Jap. Obst. and Gyn. Soc.*, **9**, 257 (1962).

6) 松本久男, 山口誠哉, 日衛誌, **27**, 119 (1972).

7) 高橋 等, 総合臨床, **23**, 37 (1974).

8) 水銀化合物の溶液濃度, 投与量および定量値はすべてHg量として表示した。

9) MM, MM-cys($\times 0.5$ — $\times 10$)溶液をそれぞれ直接ベンゼン抽出し, GLC (ECD 付)で CH_3HgCl を定量した結果, MMは全含有量が, MM-cys($\times 0.5$)は含有量の約半分が検出されたが, MM-cys($\times 1$ — $\times 10$)はほとんど検出されず, MMとシステインが結合していることを示していた。

TABLE I. Distribution of Mercury in the Tissues at Two Hours after the Intravenous Injections of Mercury Compounds into Pregnant Rats

Mercury compound	Dose (Hg mg/kg)	No. ^{a)}	No. ^{b)}	Mercury contents (Hg μ g/g)						Ratio : (B)/(A)
				Blood	Liver	Kidney	Brain	Placenta (A)	Fetus (B)	
MM	2	3	33(11, 11, 11)	7.5 $\pm$ 1.5	2.3 $\pm$ 0.7	8.1 $\pm$ 1.8	0.5 $\pm$ 0.1	3.0 $\pm$ 0.8 ^a	0.7 $\pm$ 0.2 ^a	0.23 $\pm$ 0.07 ^b
MM-cys ($\times 10$)	2	3	33(10, 11, 11)	6.7 $\pm$ 1.0	2.8 $\pm$ 0.9	10.2 $\pm$ 2.1	0.8 $\pm$ 0.1	4.2 $\pm$ 0.9 ^a	1.2 $\pm$ 0.3 ^a	0.29 $\pm$ 0.08 ^b
MM	1	3	35(11, 12, 12)	3.5 $\pm$ 0.9	1.1 $\pm$ 0.2	4.0 $\pm$ 1.1	0.3 $\pm$ 0.0	1.8 $\pm$ 0.5 ^a	0.4 $\pm$ 0.1 ^a	0.22 $\pm$ 0.07 ^b
MM-cys ($\times 10$)	1	3	35(11, 12, 12)	3.0 $\pm$ 0.7	1.5 $\pm$ 0.3	5.3 $\pm$ 1.3	0.5 $\pm$ 0.1	2.4 $\pm$ 0.5 ^a	0.7 $\pm$ 0.2 ^a	0.28 $\pm$ 0.08 ^b
M	2	3	33(11, 11, 11)	3.3 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 0.9	95.7 $\pm$ 7.1	0.0 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.5	0.0 $\pm$ 0.0	—
M-cys ($\times 10$)	2	3	32(10, 11, 11)	3.1 $\pm$ 0.8	4.3 $\pm$ 1.0	95.9 $\pm$ 9.0	0.0 $\pm$ 0.0	1.6 $\pm$ 0.6	0.0 $\pm$ 0.0	—

mean $\pm$ s.d.

a) number of pregnant rats.

b) number of placentae or fetuses.

MM: methylmercury (CH_3HgCl) solution.MM-cys ($\times 10$): MM added cysteine solution. The molarity of cysteine was ten times that of mercury.M: inorganic mercury (HgCl_2) solution.M-cys ($\times 10$): M added cysteine solution. The molarity of cysteine was ten times that of mercury.The difference between MM group and MM-cys ($\times 10$) group was significant ($a: p < 0.001$, $b: p < 0.01$).

MM, MM-cys ($\times 10$) をそれぞれ 2 mg/kg および 1 mg/kg 血管内へ投与したとき、投与量の多い方が各臓器中濃度は高くなった。

同量投与のとき、血液中には MM-cys ($\times 10$) 群は MM 群よりやや低値であったが、その他の臓器では逆の傾向を示した。胎盤および胎仔中濃度は MM-cys ($\times 10$) 群が MM 群のそれぞれ 1.3—1.4, 1.7—1.8 倍高値であり、両群に有意差 ($p < 0.001$) が認められた。

胎盤から胎仔への水銀の移行率を胎仔/胎盤の濃度比 (以下、胎仔/胎盤比と略す) からみると、2 mg/kg および 1 mg/kg 投与において MM 群, MM-cys ($\times 10$) 群は平均値でそれぞれ 0.23, 0.29; 0.22, 0.28 であり、両群間に有意差 ($p < 0.01$) が認められた。

脳中の MM については、MM-cys ($\times 10$) 群は MM 群の 1.6—1.7 倍高値であり、高橋⁷⁾の結果と一致した。

一方、M および M-cys ($\times 10$) の 2 mg/kg 投与群は、同量投与の MM, MM-cys ($\times 10$) 群と比較し、血液中濃度はその約 1/2、腎ではその約 10 倍高値を示し、M はシステインの存否にかかわらず、腎に蓄積しやすいことが認められた。胎盤中濃度は M, M-cys ($\times 10$) とともに平均値が 1.6 μ g/g であり、両者に差が認められなかった。胎仔では脳とともにほとんど検出されず、M, M-cys ($\times 10$) は胎仔、脳へほとんど移行せず、システインによっても M の胎盤透過、脳内移行はほとんど起こらない

ことが認められた。

以上より、投与水銀量の 10 倍モル量のシステインをあらかじめ添加した MM-cys ($\times 10$) 群は MM 群に比べ、MM が胎仔へ移行・蓄積しやすく、しかも胎仔/胎盤比も高くなることが認められた。

2) システインの添加量による MM の胎仔への移行・蓄積量の変化 MM-cys 溶液について、投与水銀量に対するシステインの添加量を変え、胎仔への MM の移行・蓄積量の変化を検討し、その結果を Fig. 1 に示す。

システインが添加されている MM-cys 群は MM 群に比較し、胎盤および胎仔中濃度は、いずれも有意に ($p < 0.01$) 高値を示した。

胎仔/胎盤比では MM-cys ($\times 0.5$) 群と MM-cys ($\times 1$) および MM-cys ($\times 10$) の各群と MM 群との間では、ともに有意差 ($p < 0.01$) が認められた。また、MM-cys ($\times 1$) 群と MM-cys ($\times 10$) 群を比較すると、胎盤、胎仔中水銀濃度 および 胎仔/胎盤比とも両群に明らかな差は認められなかった。MM へ添加したシステイン濃度が水銀の等モル濃度以上で胎盤中濃度が MM のみの場合よりも有意に高くなるとともに、一定の移行率を示して、胎仔中の濃度を高めるものと考えられる。

そこで、MM とシステインを別々にラット体内へ投与したとき、同様にシステインの影響が現われるかどうか

Fig. 1. Effect of Cysteine Concentration on the Distributions of Placental and Fetal Mercury Contents

Two pregnant rats were submitted to each treatment. Mercury contents in the placentae and fetuses at two hours after the intravenous injections of mercury solutions (dose: 1 mg Hg/kg) were determined.

MM: methylmercury solution.

MM-cys (×0.5), MM-cys (×1) and MM-cys (×10): MM added cysteine solutions.

The number in the parentheses expressed the ratios of cysteine molarity to that of mercury.

a) number of placentae or fetuses

▨: placental mercury contents (A),

▤: fetal mercury contents (B),

□: ratio: (B)/(A),

—|—: mean ± s.d.

を検討した。

3) システインの投与方法の違いによる MM の胎仔への移行・蓄積量の変化 MM を投与するとき、MM 単独投与の場合およびシステインの前投与、後投与の場合における胎仔への MM の移行・蓄積量を検討した。その結果を Fig. 2 に示す。

胎盤および胎仔中の水銀濃度はシステインを前投与、後投与したいずれの場合も先の MM-cys (×0.5—×10) 投与のときと同様に MM 群より有意に ($p < 0.01$) 高かった。

胎仔/胎盤比について、システインの前投与、後投与の各群と MM 群を比較すると、cys (×10)+MM および MM+cys (×10) の両群と MM 群との間には先の MM-cys (×10) 投与のときと異なり、有意差は認められなかった。しかし cys (×100)+MM および MM+cys (×100) の両群と MM 群との間には有意差 ($p < 0.05$) が認められた。

cys (×10)+MM および MM+cys (×10) の両群は先の MM-cys (×10) 群の場合とラット体内へ投与されたシステインの量は同じであるが、胎仔/胎盤比において、MM-cys (×10) 群と異なり、MM 群との間に有意差が

Fig. 2. Effect of Cysteine on the Distributions of Placental and Fetal Mercury Contents

Two pregnant rats were submitted to each treatment. The methylmercury solution (MM) was injected intravenously (dose: 1 mg Hg/kg).

Cysteine solutions, cys (×10) and cys (×100), were also injected intravenously at ten minutes before [abbreviated to "cys (×10)+MM" and "cys (×100)+MM"] or after [abbreviated to "MM+cys (×10)" and "MM+cys (×100)"] the injection of methylmercury solution.

Mercury contents in the placentae and fetuses at two hours after the injection of methylmercury solution were determined.

MM: methylmercury solution.

cys (×10) and cys (×100): cysteine solutions.

The number in the parentheses expressed the ratios of cysteine molarity to that of mercury.

a) number of placentae or fetuses

▨: placental mercury contents (A),

▤: fetal mercury contents (B),

□: ratio: (B)/(A),

—|—: mean ± s.d.

認められなかった。しかし、cys (×100)+MM および MM+cys (×100) の両群では胎仔/胎盤比においても MM 群と有意差が認められ、しかも先の MM-cys (×1), MM-cys (×10) 投与の場合とほぼ同じ傾向を示した。このことはラット体内へ MM とシステインを別々に投与したときも血液中で MM にシステインが作用し、先の *in vitro* で MM にシステインを添加し、MM のシステイン化合物としてから血管内へ投与した場合と同じようになるものと考えられる。ただし *in vivo* での MM とシステインの結合には *in vitro* での反応と異なり、過剰のシステインを必要とし、cys (×100) 投与で MM-cys (×1), MM-cys (×10) 投与の場合とほぼ同じになったものと考えられる。

2. 血液中 MM におよぼすシステインの影響

ラット尾静脈へ MM を前投与し、システインを後投与した場合、MM は血液中で、まずヘモグロビンなど

の SH 基と結合すると考えられる。¹⁰⁾ 血液中に遊離の MM が存在しないことは住野¹¹⁾ も述べているが、著者らも MM 水溶液をラットの血管内へ投与して得た血液を直接ベンゼン抽出したものを GLC (ECD 付) に注入しても CH_3HgCl が全く検出されず、同様の結果を認めた。

血液中でヘモグロビンなどの SH 基と結合している MM にシステインが投与されたとき、MM はシステインによって遊離してくるか否かを透析により検討した。

ラットへ MM-cys 水溶液を経口投与して得た血液試料の透析結果を Table II に示す。

TABLE II. Effect of Cysteine on Removal of Methylmercury from the Diluted Blood Solution

Concentration of cysteine (Outer soln.) (μM)	Mercury content		(A)/(A) + (B) $\times$ 100 (%)
	Outer soln. (A) (Hg $\mu\text{g}/5\text{ ml}$)	Inner soln. (B) (Hg $\mu\text{g}/2\text{ ml}$)	
0	0.05	2.03	2
5	0.12	1.90	6
50	0.34	1.60	17
500	0.65	1.30	33
1000	0.89	1.04	46

One ml of whole blood obtained at 2 hours after oral administration of methylmercury-cysteine solution (2 mg/kg) to rat was hemolyzed with 1 ml of distilled water and diluted with the phosphate buffer solution (pH 7.4) to 10 ml. Two ml of the above solution were dialyzed against 5 ml of the buffer solution (pH 7.4) containing cysteine at 37° for 48 hours.

MM の内液 (血液試料) から外液 (システイン含有溶液) への移行量は外液中のシステイン濃度が 0 μM のときは全体の 2%, 5 μM のときおよび 50 μM のときはそれぞれ全体の 6%, 17% であり、システイン濃度が高くなるに従って移行量が増大する傾向が認められ、システイン濃度が 1000 μM では全体の 46% が外液へ移行した。

MM 水溶液, MM-cys ($\times 1$) 水溶液をラットの血管内へ投与して得た血液試料についてもそれぞれ同様に透析を行なったが、その結果は、いずれも Table II とほとんど同じ傾向を示した。

Hirayama ら,¹²⁾ 松本ら¹³⁾ は MM と蛋白質を *in vitro* で結合させた $\text{CH}_3\text{Hg-Protein}$ を用い、システインを含む種々の SH 化合物で透析したところ、システインには MM を蛋白から遊離させる作用のあることを認めている。著者らは *in vivo* で得た血液試料について、システイン濃度を高めると、血液中の MM は透析されてくることを認め、*in vitro* で得た試料についての結果と一致した。

これにより先の 3) の実験でラット血管内へ MM を投与した後、システインを過剰投与したときも、MM とヘモグロビンなどの蛋白との結合が過剰のシステインによって切断され、MM がシステインの化合物となりうることが示唆された。また、3) の実験から過剰のシステインを投与した後 MM を投与した場合も、過剰のシステインを後投与したときとほぼ同様の結果が得られたことから、いずれの場合もシステインが関与し、最終的には血液中で MM がシステインの化合物となって MM よりも胎盤を透過しやすくなり、胎仔への移行・蓄積量も増したものと考えられる。

総 括

水銀化合物の胎盤透過、胎仔移行におよぼすシステインの影響を妊娠ラットを用いて検討し、次の知見が得られた。

- 1) MM にシステインをあらかじめ投与水銀量の等モル量以上添加した水溶液を血管内投与した群は MM 水溶液のみを血管内投与した群に比較し、胎盤、胎仔中 MM 濃度および胎仔、胎盤中 MM 濃度の比 (胎仔/胎盤比) とも有意に高値を示した。
- 2) MM 水溶液とシステイン水溶液を別々に血管内へ投与した場合も、システインが過剰に投与されたときは 1) の結果と同様の傾向が認められた。
- 3) M の胎盤透過、胎仔移行に関してはシステインのあるなしにかかわらず、その影響は認められなかった。
- 4) システインは MM の胎盤透過、胎仔移行に関与することは明らかであり、投与された MM がシステインの化合物であることが MM の胎盤透過性を高める 1 つの因子であると考えられ、システインは MM の胎盤透過性を高める 1 つの物質であることが認められた。

- 10) Y. Takeda, T. Kunugi, T. Terao, T. Ukita, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **13**, 165 (1968); 浮田忠之進, 武田 寧, 神経進歩, **13**, 123 (1969); 入鹿山旦郎, 近藤孝子, 牛草貞雄, 日衛誌, **21**, 371 (1967).
- 11) 住野公昭, “水銀とセレン,” 鈴木継美, 大井 玄, 井村伸正編著, 篠原出版, 東京, 1977, pp. 179—181.
- 12) K. Hirayama, H. Takahashi, *Kumamoto Medical J.*, **23**, 56 (1970).
- 13) 松本久男, 山口誠哉, 日衛誌, **29**, 55 (1974).

謝辞 本研究について御助言賜わった岐阜薬科大学
薬剤学助教授 小木曾太郎博士に深謝するとともに、動
物実験にあたり御助力賜わった名古屋市衛生研究所微生

物部技師 川原 真氏，その他実験の遂行にあたって
御協力賜わった同研究所環境医学部の諸氏に深謝致しま
す。