

$\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$  を用いた水銀中毒に関する実験的研究

## 第 2 編

## 細胞内顆粒に於ける蛋白結合水銀の分布に関する研究

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 緒方正名教授)

大学 院 生 只 友 淳 雄

〔昭和 37 年 8 月 16 日受稿〕

## 緒 言

水銀中毒は最初水銀鉱山に於いて鉱山労働者の間に発生した職業病<sup>1)</sup>であるが、急速な近代産業の発展と共に水銀の需要も増加し、その用途も拡大して各種の産業場に於いて職業性水銀中毒の報告<sup>2)-7)</sup>があり、又、水銀が農薬として登場しこれによる中毒の発生も懸念されている。<sup>8)9)</sup>一方、水銀は医薬品として治療剤或は消毒剤として用いられ時に過誤、犯罪、自殺の目的による水銀中毒の発生が報告されている。<sup>10)</sup>

水銀の生体に及ぼす影響についての研究は水銀中毒の本態の究明、治療或は予防対策を考慮する上に必要であつて幾多の基礎的研究がなされている。殊に生体内に於ける水銀の臓器分布に関しては、Ludwig<sup>11)</sup>、Ullmann<sup>12)</sup>に始まり、Ahlmark<sup>13)</sup>、Lundgren<sup>14)</sup>、Fitzhugh<sup>15)</sup>、Prickett<sup>16)</sup>、Lipman<sup>17)</sup>、Friberg<sup>18)</sup>、Patrica<sup>19)</sup>、Bergstrand<sup>20)</sup>、Swenson<sup>21)</sup>、William<sup>22)</sup>、加藤<sup>23)</sup>、松田<sup>24)</sup>、西連寺<sup>25)</sup>、三浦<sup>26)</sup>、小林<sup>27)</sup>等の研究がある。

然しながら、過去に於ける研究は生体各臓器単位に於ける総水銀(蛋白結合水銀+遊離水銀)の分布のみを対象として研究を行なつたものである。著者は第 1 編に於いて組織蛋白結合水銀並びに非蛋白結合水銀に注目して、海溟組織に於ける総水銀に対する蛋白結合水銀の割合並びに蛋白結合水銀の生体内分布の研究を行い発表した。今回は水銀の分布を細胞内顆粒(核、ミトコンドリア、マイクロソーム)に注目して細胞単位の研究を行なつた。即ち、細胞の原形質内には核を含めて何種類かの微少な顆粒が数多く存在しており、これらは細胞形態学のみならず、物質代謝の面からも、酵素分布の面からも決して均一のものではなく、化学的組成についても、又その量も異なる幾多の面をもつてそれぞれ特有

の事実が知られており、これらのことに關係し細胞内顆粒に於ける蛋白結合水銀の分布状態を検討することは、水銀中毒の解明に重要な意義を有するものと考え、海溟に放射性硝酸水銀を投与し最も水銀の集積性の強い腎臓及び肝臓を用いて、Schneider<sup>28)</sup>の方法に従つてこれら臓器の Homogenate より細胞内顆粒を分離し、蛋白結合水銀の細胞内顆粒に於ける分布の研究を行なつて興味ある成績を得たのでその結果を以下に発表する。

## 実 験 材 料

1. 放射性同位元素  $\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$  の調整

本実験に使用した放射性水銀は、社団法人日本放射性同位元素協会より送附された OAK RIDGE NATIONAL LABORATORY (OAK RIDGE, TENNESSEE) 製の硝酸溶液に溶解した  $\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$  を使用した。

$\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$  の半減期は 43.5 日、放射能エネルギー (MeV) は  $\beta$  線が 0.205,  $\gamma$  線が 0.286 である。<sup>29)</sup>

本実験に際しては Isotope 自身の汚染をさけるために、 $\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$  を取扱う実験器具は一般実験器具とは別にして取扱つた。

## 2. 実験動物

成熟した健康な海溟を実験 1 週間前から豆腐粕(おから)を用いて飼育し、その健康状態を確かめた後に実験に供した。なお、海溟の飼育環境温度は 15°C 前後に保つた。

## 3. 実験器具

- a. Potter-Elvehjem Type Homogenizer<sup>31)32)</sup>
- b. 1/20 馬力電気モーター (Homogenate 作成に用いた。)
- c. Polyethylen 製遠心沈澱管
- d. 超高速遠心機 FT-9S 型 (久保田製作所製)

- e. Well Type Sincillation Counter (γ線測定に  
対し感度の優れたものを使用した。<sup>29)</sup>)
  - f. 試料皿 (試料の乾燥の際に用い、乾燥時に腐  
蝕による変化を受けないガラス製のものを使  
用した。)
  - g. 乾燥器
  - h. Cellophane 紙 (透析膜として試料の透析に  
用い、孔口は直径平均 30Å (20~95Å) で  
分子量 13,000 迄は透析可能である<sup>30)</sup>。)
  - i. 自動直示天秤
4. 試薬
- a. 0.25 Mol Sucrose 溶液

### 実験方法

#### 1. 放射性水銀 $Hg^{203}(NO_3)_2$ の投与

実験方法の概要は第1表に示す。即ち、日本放射  
性同位元素協会より送附された OAK RIDGE NA-  
TIONAL LABORATORY (OAK RIDGE, TEN-  
NESSEE) 製の硝酸溶液に溶解した  $Hg^{203}(NO_3)_2$  の

ものに蒸留水を加えて 0.2 ml の溶液中に 600,000  
cpm の  $Hg^{203}(NO_3)_2$  を含む様に稀釈した。

実験に用いた海猿はA群、B群、C群に分ち、  
稀釈した  $Hg^{203}(NO_3)_2$  溶液をA群海猿に12,000,000  
cpm/kg (水銀として 0.26 mg/kg)、B群海猿に  
6,000,000 cpm/kg (水銀として 0.13 mg/kg)、C  
群海猿に 1,200,000 cpm/kg (水銀として 0.026  
mg/kg) 宛各群の海猿の背部筋肉内に注射した。

#### 2. 臓器の剔出

注射後海猿を絶食させ、24時間後に頸動脈切開放  
血法<sup>30)</sup> によつて失血死に至らしめ、直ちに腹部切  
開を行なつて海猿の腎臓及び肝臓を剔出した。

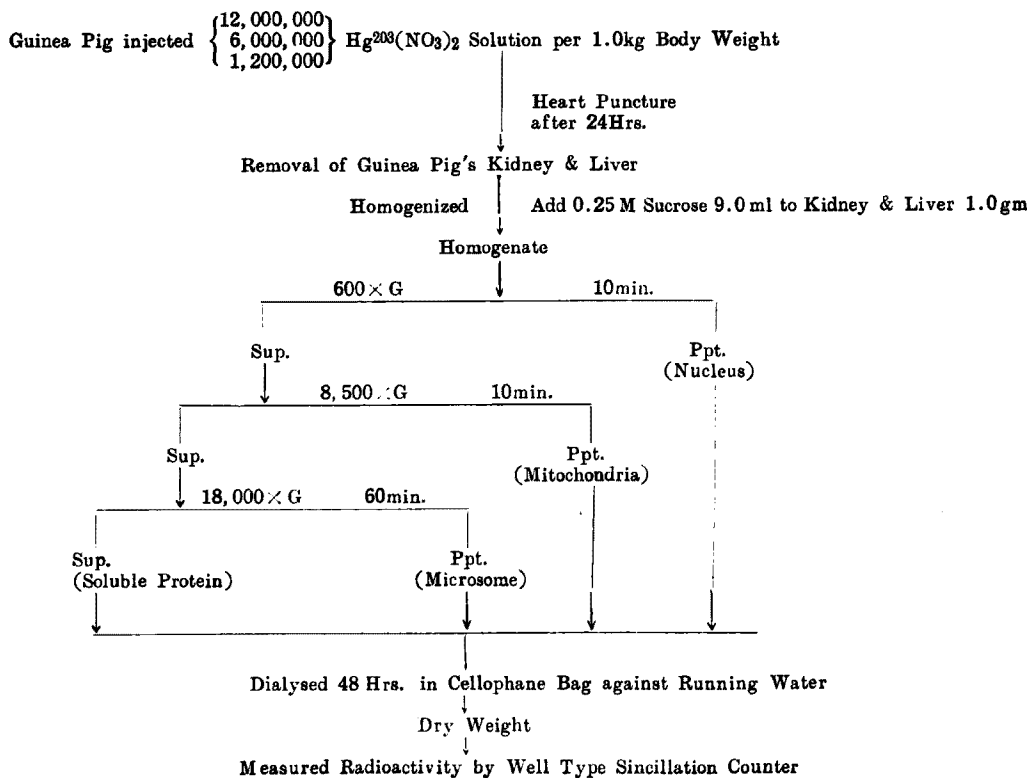
#### 3. Homogenate の作成<sup>31,32)28)</sup>

海猿の腎臓及び肝臓を等張水冷 0.25 Mol Sucrose  
溶液で洗滌し血液を除き、洗滌後臓器を鉄でこまか  
く切り碎いて結合組織を除くために 1.0 mm Mesh  
のうろごしにかけた。

この様にして得られた腎臓及び肝臓 1.0gm 当  
り 9.0ml の水冷 0.25 Mol Sucrose 溶液を加え、

Table 1: Experimental Procedures on Distribution of  $Hg^{203}$  in Intracellular Granules  
of Guinea-Pig kidney that injected  $Hg^{203}(NO_3)_2$

#### Experimental Procedures



原形質中に含まれる細胞成分の変性及び損傷を少なくし均一の臓器 Homogenate を作成するために Pyrex ガラス製の Potter-Elvehjem 型 Homogenizer<sup>31)32)</sup> に入れ、Homogenizer の外套管を氷片で冷却し 0°~4°C に保ち、回転させる乳棒軸を肉厚のゴム管で 1/20 馬力のモーターに接続し、磨擦熱による組織細胞の自家融解を防ぎながら約 1,000 rpm 2 分間、機械的力によつて細胞膜を破壊し腎臓及び肝臓の Homogenate を作成した。(Harman<sup>33)</sup> は homogenize の時間が長がいと Mitochondria の数が減少し、酵素活性が弱くなることを指摘し 5 分間の回転によつて活性は部分的に零となり、Mitochondria 数は半分になると述べている。)

#### 4. 細胞内顆粒の分離<sup>28)</sup>

腎臓及び肝臓の Homogenate を Schneider<sup>28)</sup> の方法によつて超高速遠心機を用いて、細胞内顆粒をその比重に従つて分割遠心沈澱を行い、核 (Nucleus)、ミトコンドリア (Mitochondria)、マイクロゾーム (Microsome) 及び無顆粒性溶性部分 (Soluble Protein) に分離した。その詳細は以下に示す如くである。

##### a. Nucleus の分離

腎臓及び肝臓の Homogenate を駒込ピペットにより Polyethylen 製の遠沈管に移し、超高速遠心機の回転熱による細胞顆粒の自己融解を防ぐために 2°~5°C の可及的低温に保つた温度下に於いて超高速遠心機 FT-9S 型に入れ、600×g 10 分間遠心沈澱し、細胞核、未破壊細胞及び赤血球を沈澱せしめ、その上澄液は毛細管ピペットで他の遠沈管に移す。この沈澱物に少量の 0.25 Mol Sucrose 溶液を加え分散させ再び 600×g 10 分間遠心沈澱する。この操作を 2 度くりかえし行なつて、Homogenate から腎臓及び肝臓の細胞核を分離し、この沈澱に少量の 0.25 Mol Sucrose 溶液を加え、ガラス棒で攪拌分散せしめ海猿の腎臓及び肝臓の Nucleus の懸濁液を作成した。

##### b. Mitochondria の分離

Homogenate より細胞核を得た際の最初の上澄液及び分散後再遠心の上澄液を合せて Polyethylen 製の遠沈管に入れ、8,500×g 10 分間遠心沈澱し Mitochondria を沈澱させ、沈澱上部の上澄液を毛細管ピペットで他の遠沈管に移す。この際に Mitochondria のしつかり沈澱した黄褐色様物質の直上部の不十分な沈澱を示したピンク様の物質、即ち、いわゆる Fluffy Layer は上澄液方に加える。<sup>34)</sup> この沈澱物は適量の 0.25 Mol Sucrose 溶液に分散

させて、8,500×g 10 分間再遠心する。この操作を 2 回行い最後に適量の 0.25 Mol Sucrose 溶液を加えて、ガラス棒で攪拌分散せしめ海猿の腎臓及び肝臓の Mitochondria 懸濁液を作成した。

##### c. Microsome の分離

Mitochondria 分離の際の上澄液を合して 18,000×g 60 分間遠心沈澱し、その上澄液を他の遠沈管に移し、沈澱物を 0.25 Mol Sucrose 溶液に分散させ、18,000×g 60 分間再遠心し透明な赤味をおびた沈澱物が得られる。この沈澱物を 0.25 Mol Sucrose 溶液の適量に分散せしめ、海猿の腎臓及び肝臓の Microsome 懸濁液を作成した。

##### d. Soluble Protein の分離

Microsome 分離の際の上澄液を合して 18,000×g 60 分間再遠心沈澱し、その上澄液を海猿の腎臓及び肝臓の Soluble Protein とした。

#### 5. 透析法<sup>35)36)37)</sup>

海猿の腎臓及び肝臓の Homogenate 並びに分割遠心によつて Homogenate から得られた Nucleus, Mitochondria, Microsome の 0.25 Mol Sucrose 懸濁液、及び Soluble Protein をそれぞれ 2.0 ml 宛駒込ピペットによつて Cellophane 紙嚢に移し 48 時間流水中で透析を行なつた。即ち、透析膜外液は透析膜内中の各試料の微生物の発生、繁殖及び蛋白質の変性を抑制するために特に冬期を選び、2°~5°C の低温度に保ち (温度が上昇しない様に氷片を膜外液に投ずる。)、更に透析膜内に於ける試料液と透析膜外液との拡散速度を大きくするために膜外液を絶えず流水をもつて更新し、透析膜内外液の濃度差を大きくする様に努め 48 時間透析を行なつた。

#### 6. 水銀放射能値の測定<sup>29)</sup>

透析後の海猿の腎臓及び肝臓の Homogenate, Nucleus, Mitochondria, Microsome, Soluble Protein の各試料液を駒込ピペットによつて Wassermann 氏試験管に各々 2.0 ml 宛取り、Well Type Scintillation Counter により各試料液の水銀の  $\gamma$  線を各試料 2 分間宛測定した。この放射能値測定の操作は 2 回行なつて各試料に於ける水銀の 1 分間の平均放射能値 (cpm) を算出した。

各試料の水銀の 1 分間平均放射能値の算出に際しては、試料測定の前後に 2 分間宛各 2 回計測した自然計数値の 1 分間平均数を  $\gamma$  線の平均自然計数値とし、各試料の水銀の 1 分間平均放射能値から 1 分間平均自然計数値を差引いたものを各試料に於ける蛋白結合水銀の 1 分間平均放射能値とした。

Table 2: Distribution of  $Hg^{203}$  in Intracellular Granules of Guinea-Pig Kidney [6,000,000 cpm/kg of  $Hg^{203}(NO_3)_2$ ]

Guinea-Pig No.	No. 1		No. 2		No. 3		No. 4		No. 5	
	370 gm		380 gm		440 gm		410 gm		420 gm	
Body Weight										
Cell Fractions	$\frac{cpm}{mg}$		$\frac{cpm}{mg}$		$\frac{cpm}{mg}$		$\frac{cpm}{mg}$		$\frac{cpm}{mg}$	
	$\frac{cpm}{mg}$	$\frac{cpm}{mg}$	$\frac{cpm}{mg}$	$\frac{cpm}{mg}$	$\frac{cpm}{mg}$	$\frac{cpm}{mg}$	$\frac{cpm}{mg}$	$\frac{cpm}{mg}$	$\frac{cpm}{mg}$	$\frac{cpm}{mg}$
HOMOGENATE	69,780 48.7	1,432.85 238.81	32,478 21.9	1,483.01 247.17	35,460 26.7	1,328.09 221.35	37,328 27.4	1,359.85 226.64	35,343 25.1	1,405.29 234.22
NUCLEUS	38,949 53.2	732.12 122.02	22,292 31.2	714.49 119.08	25,161 36.1	696.98 116.16	24,339 32.8	742.04 123.67	24,191 33.7	717.83 119.64
MITOCHONDRIA	27,722 34.2	810.58 135.10	14,821 18.4	805.49 134.25	12,955 16.6	780.42 130.07	25,120 30.7	818.24 136.37	31,824 39.8	779.60 129.93
MICROSOME	17,914 18.9	947.83 157.97	7,525 7.8	964.74 160.79	7,919 8.9	889.78 148.30	10,909 11.7	932.39 155.40	13,470 14.1	955.32 159.22
SOLUBLE PROTEIN	51,300 15.1	3,397.35 566.23	28,182 10.0	2,818.20 469.70	27,918 10.3	2,710.49 451.75	33,053 10.8	3,060.46 510.08	35,561 12.5	2,844.88 474.15

## 7. 乾燥重量の測定

放射能値測定後の試料液は、各試料液ごとに内径 2.5 cm、深さ 0.5 cm のガラス製の試料皿に駒込ピペットでその全量を移し（各試料採取の際に試験管壁並びに駒込ピペットに試料が残らない様にするために 1.5 ml の蒸留水で洗滌し、この洗滌液を試料皿に加える。）70°C 24時間、乾燥器の中で完全に乾燥せしめ、乾燥後自動直示天秤で秤量し予め測定して置いた試料皿の各重量を差引き各試料の乾燥重量とした。

以上の実験により、各試料に於ける水銀の 1 分間平均放射能値を各試料の乾燥試料重量で除し、乾燥重量 1.0 mg 当りの蛋白結合水銀の比放射能値を算出し、海狼の腎臓及び肝臓に於ける Nuclear Fraction, Mitochondrial Fraction, Microsomal Fraction 及び Soluble Protein の蛋白結合水銀の分布状態を海狼に注射した各種濃度の放射性水銀  $Hg^{203}(NO_3)_2$  について比較検討した。

## 実験結果

## 1. 蛋白結合水銀の腎臓細胞内顆粒の分布

海狼の背部筋肉内に体重 1.0 kg 当り放射性水銀  $Hg^{203}(NO_3)_2$  を 6,000,000 cpm（水銀として 0.13 mg/kg）注射し、投与 24 時間後に海狼の腎臓を剔出し作成した腎臓の Homogenate を Schneider<sup>28</sup>) の方法に従って Nucleus, Mitochondria, Microsome, Soluble Protein に分離した。

第 2 表はこれら腎臓の各細胞内顆粒並びに無顆粒性溶性部分を透析し、透析後の蛋白結合水銀の放射能値を測定して体重 1.0 mg 当りの投与水銀放射能値に対する各試料の乾燥重量 1.0 mg 当りの蛋白結合水銀の比放射能値（ $\frac{\text{乾燥蛋白重量} 1.0 \text{ mg 当りの放射能値}}{\text{体重} 1.0 \text{ mg 当りの投与水銀放射能値}}$ ）を実験と

行つた海豚の各々6例について示したものである。  
第8表A及び第1図はそれぞれの値の平均値を示したものである。

即ち、体重 1.0 mg 当りの投与水銀放射能値に対する乾燥蛋白重量 1.0 mg 当りの蛋白結合水銀の比

放射能値で比較すると、腎臓の各細胞分割に於ける蛋白結合水銀の分布は Soluble Protein (494.38) > Microsome (156.34) > Mitochondria (133.14) > Nucleus (120.11) の順序であり、Soluble Protein に集積性が強く Microsome の 3.2 倍、Mitochondria の 3.7 倍、

Table 8: Distribution of Hg<sup>203</sup> in Intracellular Granules of Kidney & Liver of Guinea pig  
[6,000,000 cpm/kg of Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

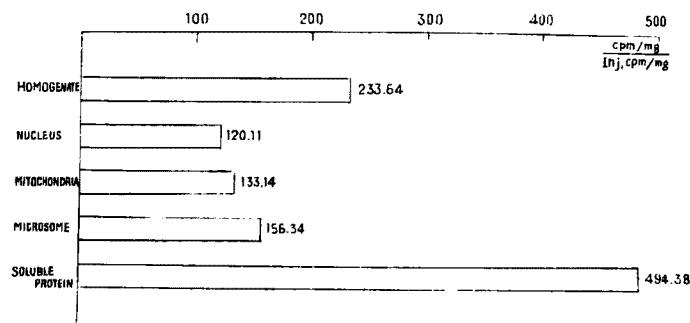
Table 8A: Kindey  $\frac{\text{cpm/mg}}{\text{Injected cpm/mg}}$

Cell Fr. Guinea-Pig No.	HOMOGENATE	NUCLEUS	MITOCHONDRIA	MICROSOME	SOLUBLE PROTEIN
No. 1	238.81	122.02	135.10	157.97	566.23
No. 2	247.17	119.08	134.25	160.79	469.70
No. 3	221.35	116.16	130.07	148.30	451.75
No. 4	226.64	123.67	136.37	155.40	510.08
No. 5	234.22	119.64	129.93	159.22	474.15
sum	1168.19	600.57	665.72	781.68	2471.91
Mean ± σ	233.64 ± 9.00	120.11 ± 2.72	133.14 ± 3.27	156.34 ± 4.24	494.38 ± 40.63

Table 8B: Liver  $\frac{\text{cpm/mg}}{\text{Injected cpm/mg}}$

Cell Fr. Guinea-Pig No.	HOMOGENATE	NUCLEUS	MITOCHONDRIA	MICROSOME	SOLUBLE PROTEIN
No. 1	5.48	4.57	3.43	3.73	10.47
No. 2	6.34	4.91	4.26	3.28	11.64
No. 3	5.90	4.08	3.84	3.90	9.50
No. 4	5.13	4.06	4.26	4.49	8.90
No. 5	6.78	4.89	3.91	4.89	10.96
sum	29.63	22.51	19.70	20.29	51.47
Mean ± σ	5.93 ± 0.56	4.50 ± 0.39	3.94 ± 0.10	4.06 ± 0.56	10.29 ± 1.03

Fig. 1: Radioactivity Ratio of Hg<sup>203</sup> in Intracellular Granules of Guinea-Pig kidney  
[6,000,000 cpm/kg of Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]



Nucleusの4.1倍であつた。

$Hg^{203}(NO_3)_2$  を前述の2倍量、即ち、12,000,000 cpm (水銀として0.26 mg/kg) を注射した場合の蛋白結合水銀の腎臓各細胞分劃に於ける分布は、第3表に示す如く Soluble Protein > Microsome > Mitochondria > Nucleus の順序であつた。又、前述の1/5倍量、即ち、1,200,000 cpm (水銀として0.026 mg/kg) の投与を行なつた場合も第4表に示す如く Soluble Protein > Microsome > Mitochondria > Nucleus の順序であり、いずれの場合も蛋白結合水銀は Soluble Protein に多く分布し、且つ腎臓細胞分劃に於ける蛋白結合水銀の分布については投与水銀量に拘らずその順位の変動を認めなかつた。

腎臓の Homogenate 及び腎臓の各細胞分劃に於ける蛋白結合水銀の分布を投与水銀量によつて比較すれば、第2図に示す如く、Homogenate に於いては投与水銀量に対する蛋白結合水銀は  $\left( \frac{\text{乾燥蛋白重量}}{\text{体重}} \times \frac{1.0 \text{ mg 当りの蛋白結合水銀比放射能値}}{1.0 \text{ mg 当りの投与水銀放射能値}} \right)$  注射量の少ない方がかえつて多い。このことは Soluble Protein に於いて投与水銀量に対し蛋白結合水銀が注射量の少ない方が多いことによく一致するものであり、

Microsome, Mitochondria, Nucleus にはこの様な関係は認められなかつた。

## 2. 蛋白結合水銀の肝臓細胞内顆粒の分布

海豚に  $Hg^{203}(NO_3)_2$  を体重1.0 kg 当り6,000,000 cpm (水銀として0.13 mg/kg) 投与した場合の肝臓の細胞分劃に於ける乾燥重量1.0 mg 当りの蛋白結合水銀の分布は、第5表及び第8表Bに示す如く Soluble Protein (10.29) > Nucleus (4.50) > Microsome (4.06) > Mitochondria (3.94) の順位で肝臓に於いても、又、腎臓と同じく Soluble Protein に蛋白結合水銀が多く、Nucleus の2.2倍、Microsome の2.5倍、Mitochondria の2.6倍であつた。又、腎臓細胞内顆粒の蛋白結合水銀の分布状態に比較して肝臓細胞内顆粒に於いては Nucleus のみ順位の変動があつたが Microsome, Mitochondria には順位の変動はなかつた。

第6表及び第7表に示す如く、 $Hg^{203}(NO_3)_2$  を12,000,000 cpm/kg 投与の場合に於いても、又、1,200,000 cpm/kg の投与の場合に於いても肝臓の各細胞分劃に於ける蛋白結合水銀の分布は前述と同様の順序であつた。

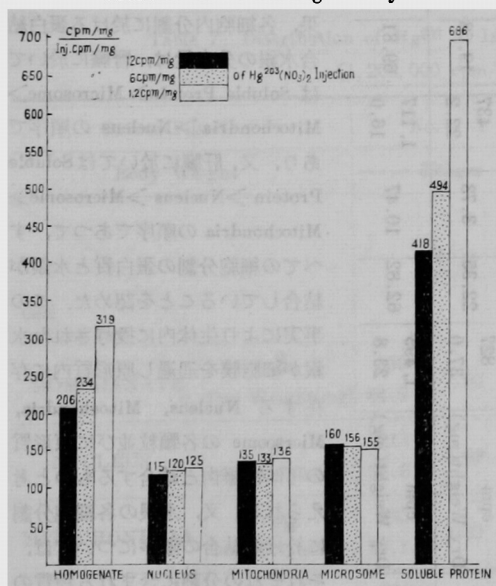
Table 3: Distribution of  $Hg^{203}$  in Intracellular Granules of Guinea-Pig Kidney  
[12,000,000 cpm/kg of  $Hg^{203}(NO_3)_2$ ]

Guinea-Pig No.	Body Weight	Cell Fractions	HOMO-	NUCLEUS	MITO-	MICRO-	SOLUBLE
			GENATE		CHONDRIA	SOME	PROTEIN
No. 1	660 gm	cpm	48,849	37,279	35,209	22,151	28,393
		Dry Weight (mg)	20.2	27.6	20.9	11.3	5.7
		$\frac{\text{cpm}}{\text{mg}}$	2,418.27	1,350.69	1,684.64	1,960.27	4,981.23
		$\frac{\text{cpm/mg}}{\text{Inj. cpm/mg}}$	201.52	112.56	140.39	163.36	415.10
No. 2	610 gm	cpm	61,264	34,668	21,464	27,645	50,546
		Dry Weight (mg)	24.3	24.4	13.7	14.7	10.0
		$\frac{\text{cpm}}{\text{mg}}$	2,521.15	1,420.82	1,566.72	1,880.61	5,054.60
		$\frac{\text{cpm/mg}}{\text{Inj. cpm/mg}}$	210.10	118.40	130.56	156.72	421.22
Mean			205.81	115.48	135.48	160.04	418.16
$\pm \sigma$			$\pm 4.29$	$\pm 2.92$	$\pm 4.77$	$\pm 3.32$	$\pm 3.10$

Table 4: Distribution of Hg<sup>203</sup> in Intracellular Granules of Guinea-Pig Kidney  
[1, 200, 000 cpm/kg of Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

Guinea-Pig No.		No. 1		No. 2		No. 3		Mean	
Body Weight		390 gm		330 gm		350 gm		±σ	
Cell Fractions		mg	cpm/mg	cpm/mg	mg	cpm/mg	mg	cpm/mg	
			Inj. cpm/mg	Inj. cpm/mg		Inj. cpm/mg		Inj. cpm/mg	
HOMOGENATE	cpm	14, 423	380.55	317.13	8, 972	378.57	315.48	12, 500	319.38
	Dry Weight(mg)	37.9			23.7			32.0	±4.40
NUCLEUS	cpm	6, 223	146.08	121.73	5, 824	154.48	128.73	8, 962	124.57
	Dry Weight(mg)	42.6			37.7			60.6	±7.00
MITOCHONDRIA	cpm	3, 963	160.45	133.71	2, 677	156.55	130.46	3, 959	136.29
	Dry Weight(mg)	24.7			17.1			22.8	±6.08
MICROSOME	cpm	2, 776	182.63	152.19	2, 415	178.89	149.08	2, 840	155.59
	Dry Weight(mg)	15.2			13.5			14.3	±7.13
SOLUBLE PROTEIN	cpm	9, 336	826.19	688.49	7, 482	787.58	656.32	10, 169	685.64
	Dry Weight(mg)	11.3			9.5			11.9	±22.96

Fig. 2 Radioactivity of Hg<sup>203</sup> in Intracellular Granules of Guinea-Pig Kidney



総括並びに考按

職業病としての水銀中毒は水銀鉱山に於ける中毒の発生を始めとし、近代産業の発展にともない水銀の用途が拡大し、多種多様の産業に於いて職業性

水銀中毒を惹起せしめ、<sup>2)-9)</sup> 又一方、水銀は殺菌剤、農薬、駆梅剤、利尿剤等と各方面にわたつて使用されており、しばしば水銀中毒の発生がある。<sup>10)</sup> 水銀の薬理学的、毒物学的な作用については多くの研究が古くから行われている。しかしこれらの研究はすべて臓器単位としての総水銀(蛋白結合水銀+遊離水銀)の分布について進められているものであり、細胞単位として蛋白結合水銀の細胞内顆粒の分布について研究したものはその例を見ることが出来ない。著者は産業中毒を惹起せしめる中毒物質の作用機点として、細胞内顆粒に於ける酵素機能との関係の研究の第一歩を踏出すためには水銀と細胞内顆粒蛋白との結合を研究する必要があり、放射性水銀Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>を用いてこの点を明かにしようとした。

放射性水銀 Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> を本実験に用いた理由は Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> が第1編で述べた如く、生体内でもまた蛋白質と強い結合性を有することを証明したこと。放射性水銀<sup>20)</sup> 自身が崩壊の際にβ線及びγ線を放出し強い Radioactivity を有する材料であり、細胞内顆粒の水銀の分布並びに沈着状態を追求するのに有利であること。臓器内水銀の分布を化学的に定量を試みんとする場合に先づ組織を灰化する必要があるが、水銀は沸点が357.3°Cでかなり低く試料の灰化の時に水銀が失われやすく、生体内の微量の水

Table 5: Distribution of Hg<sup>203</sup> in Intracellular Granules of Guinea-Pig Liver [6,000,000 cpm/kg of Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

Guinea-Pig No.	No. 1 370 gm		No. 2 380 gm		No. 3 440 gm		No. 4 410 gm		No. 5 420 gm	
	cpm	Inf. cpm/mg	cpm	Inf. cpm/mg	cpm	Inf. cpm/mg	cpm	Inf. cpm/mg	cpm	Inf. cpm/mg
Body Weight										
Cell Fractions										
HOMOGENATE	cpm	1,616	1,198	1,268	1,268	5.90	973	30.79	1,065	6.78
	Dry Weight(mg)	49.2	31.5	35.8	35.4	4.08	31.6	5.13	26.2	40.65
NUCLEUS	cpm	849	722	867	24.49	4.91	972	24.36	774	4.89
	Dry Weight(mg)	31.0	24.5	35.4	35.4	4.08	39.9	4.06	26.4	29.32
MITOCHONDRIA	cpm	772	642	514	23.05	3.84	835	25.54	782	3.91
	Dry Weight(mg)	37.5	25.1	22.3	23.05	3.84	32.7	4.26	33.3	23.48
MICROSOME	cpm	827	437	433	23.41	3.90	701	26.96	595	4.89
	Dry Weight(mg)	37.0	22.2	18.5	23.41	3.90	26.0	4.49	20.3	29.31
SOLUBLE PROTEIN	cpm	1,495	1,117	1,265	56.96	9.50	929	53.39	1,013	10.96
	Dry Weight(mg)	23.8	16.0	22.2	56.96	9.50	17.4	8.90	15.4	65.78

銀を正確に知ることは容易でなかつたが、放射性水銀を用いることによつて実験手段が簡単になり、生体内に分布した微量の水銀の量的把握が正確かつ容易である事などである。

一方、細胞の原形質は物質代謝の面からも酵素の分布の面から見ても決して均一なものではなく、形態学的に見ると何種類かの微小な顆粒が多数存在し、これらは細胞膜を機械的に破壊した臓器 Homogenate より分割遠心沈澱によつて Nucleus, Mitochondria, Microsome の各細胞内顆粒として酵素活性を保つた状態で分離出来る。

著者は海鯊の背部筋肉内に Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> を投与して 24 時間後に腎臓及び肝臓の剔出を行い、臓器 Homogenate を調整し、Schneider<sup>28</sup>)の方法に従つて分割遠心沈澱を行なつて、各細胞分割に於ける水銀の分布を透析後に測定した。その結果、各細胞内分割に於ける蛋白結合水銀の分布量は、腎臓に於いては Soluble Protein > Microsome > Mitochondria > Nucleus の順序であり、又、肝臓に於いては Soluble Protein > Nucleus > Microsome > Mitochondria の順序であつて、すべての細胞分割の蛋白質と水銀が結合していることを認めた。この事実により生体内に投与された水銀が細胞膜を通過し原形質内に存在する Nucleus, Mitochondria, Microsome の各顆粒並びに原形質の可溶性蛋白と結合するものと考えられる。又、水銀の各細胞分割に於ける結合の順序については、それぞれの分割に含まれる物質の特性にも関係があるとも考えられるが、分子の小さいもの程水銀の結合が多いことも一因であると思われる。

一方、細胞内顆粒のうちで特に



Table 6: Distribution of Hg<sup>203</sup> in Intracellular Granules of Guinea-Pig Liver  
[12, 000, 000 cpm/kg of Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

Guinea-Pig No.	Weight Body	Cell Fractions					
		HOMO-GENATE	NUCLEUS	MITO-CHON-DRIA	MICRO-SOME	SOLUBLE PROTEIN	
No. 1	660 gm	cpm	3,142	896	1,186	1,695	2,585
		Dry Weight (mg)	33.8	11.0	23.5	32.7	20.9
		$\frac{\text{cpm}}{\text{mg}}$	92.96	81.45	50.36	51.76	123.68
		Inj. cpm/mg	7.75	6.79	4.20	4.31	10.31
No. 2	610 gm	cpm	3,748	2,304	1,843	1,307	3,474
		Dry Weight (mg)	35.9	22.1	29.9	22.5	23.3
		$\frac{\text{cpm}}{\text{mg}}$	104.40	95.92	61.64	58.09	149.10
		Inj. cpm/mg	8.70	7.99	5.14	4.84	12.43
Mean			8.23	7.39	4.67	4.58	11.37
±σ			±0.39	±0.60	±0.47	±0.17	±1.06

Table 7: Distribution of Hg<sup>203</sup> in Intracellular Granules of Guinea-Pig Liver  
[1, 200, 000 cpm/kg of Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>]

Guinea-Pig No.	No. 1		No. 2		No. 3		Mean	
Body Weight	390 gm		330 gm		350 gm		±σ	
Cell Fractions	cpm mg	cpm/mg Inj. cpm/mg	cpm mg	cpm/mg Inj. cpm/mg	cpm mg	cpm/mg Inj. cpm/mg		
HOMOGENATE	cpm Dry Weight(mg)	356 44.9	7.93 6.61	213 33.7	6.32 5.27	313 44.8	6.99 5.83	5.90 ±0.61
NUCLEUS	cpm Dry Weight(mg)	213 38.8	5.49 4.58	134 21.8	6.15 5.13	150 34.0	4.41 3.68	4.46 ±0.62
MITOCHONDRIA	cpm Dry Weight(mg)	285 58.1	4.91 4.09	86 20.6	4.17 3.48	138 33.1	4.17 3.48	3.68 ±0.33
MICROSOME	cpm Dry Weight(mg)	248 49.2	5.04 4.20	93 15.6	5.96 4.97	110 29.4	3.74 3.12	4.10 ±0.74
SOLUBLE PROTEIN	cpm Dry Weight(mg)	259 21.5	12.05 10.04	205 19.4	10.57 8.81	256 22.8	11.23 9.36	9.40 ±0.57

Mitochondria は細胞の生命現象に深い関係があり、酵素的機能を有し中間代謝物を酸化する活性を他の細胞成分よりも豊富にもち代謝的意義の深い顆粒であると考えられている。即ち、Mitochondria は SH 酵素であるコハク酸脱水素酵素、イソクエン酸脱水素酵素、 $\alpha$ -ケトグルタル酸脱水素酵素、焦性ブドウ酸酸化酵素、トランスアミナーゼ等の多くの酵素を含む SH 基に富む蛋白質であり、かつ、磷酸 Cycle, TCA Cycle, 酸化還元 Cycle の三つの Cycle が融合し、作用上不可分の Coazervate を形成して細胞の機能維持に関して重要な役割を持つている。従つて、この三つの Cycle の何れを欠いても TCA Cycle の回転が円滑を欠き細胞の呼吸が障碍されるわけである。

次に水銀と SH 酵素との関係について考えると、蛋白質の SH 基と水銀の結合性について Hughes<sup>36)</sup> は Hg イオンが血清アルブミンの SH 基 1 個と結合することを発見し、Barron & Kalnitsky<sup>39)</sup> はコハク酸脱水素酵素の SH 基と大多数の重金属 (Hg, Pb, Sn, Bi, Co, Ni, Sb, Zn, Cd, Mg, Au, Ag) が Mercaptide を形成して結合することを認め、コハク酸脱水素酵素の機能を阻害すると述べている。又、平出<sup>40)</sup> も Mercaptide 形成剤である PCMB ( $\rho$ -Chloro-mercuribenzoate), HgCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, CdSO<sub>4</sub> 等を用いて Mitochondria のコハク酸脱水素酵素阻害と SH 基量の低下を認めている。

著者<sup>43)</sup> も酢酸水銀、エチル磷酸水銀、フェーール酢酸水銀、PCMB、マーゾニン等の各種水銀化合物の Mitochondria に於けるコハク酸脱水素酵素の阻害作用を報告している。しかしながら、蛋白質及び酵素の SH 基と水銀の結合に関してはいずれも *in vitro* で行われた実験である。これに対し著者の実験は *in vivo* に於いて細胞内顆粒の蛋白質自身と水銀が結合することを直接に明かにしたものである。それ故に、生体内に投与した水銀が Mitochondria に結合すると言う事は、Mitochondria に存在する各種の SH 酵素を阻害して TCA Cycle の円滑な回転をさまたげ、細胞の作用を障碍し臓器の機能低下を発生せしめると考えられる。この点について伊藤<sup>41)</sup> が水銀利尿剤は体内で比較的毒性の低い R-Hg の形に解離し、尿管細胞の SH 酵素系に特異的に作用してその活性を阻害し、能動的な再吸収を抑制することによつて尿量の増大を来し、かつ組織化学的に

コハク酸脱水素酵素の阻害が認められていて、この様な作用機序を裏づけるものとして BAL (2,3-Dimercaptopropanol) の投与によつて阻害された SH 基が賦活化されて利尿作用が阻止される (Handley & La Forge · 1947 年) と述べている。

勿論、著者は投与された水銀は Mitochondria ばかりでなく Nucleus, Microsome, Soluble Protein の蛋白質と結合し SH 活性酵素の阻害の可能性が *in vivo* でも起り待たれることを証明したわけである。又一方、水銀は SH 基と結合する他かにも Haarman<sup>42)</sup> が主張している様にこれら各細胞分割に於ける蛋白質の NH<sub>2</sub> 基, COOH 基とも結合し、各細胞内顆粒や可溶性無顆粒部分に於ける重要な機能を阻害し細胞の、更には、臓器の機能低下を惹起せしめると考えられる。

## 結 論

著者は水銀中毒の際の水銀の細胞に対する作用機序を明かにする目的で、水銀が細胞内顆粒蛋白と結合するか否かについて研究を行なつた。即ち、海狸の背部筋肉内に各種濃度の放射性水銀 Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> を投与し、腎臓及び肝臓の細胞内顆粒の蛋白結合水銀の分布状態を測定して以下に述べる如き結論を得た。

1) 投与水銀は腎臓及び肝臓の Nucleus, Mitochondria, Microsome, Soluble Protein のいずれの細胞分割の蛋白質とも結合を示した。

2) 体重 1.0 kg 当り 6,000,000 cpm の Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> (水銀として 0.13 mg/kg) を投与した場合、投与 24 時間後に於ける腎細胞各分割の乾燥重量 1.0 mg 当りの蛋白結合水銀の比放射能値は Soluble Protein > Microsome > Mitochondria > Nucleus の順序であつた。

又、肝臓では Soluble Protein > Nucleus > Microsome > Mitochondria の順序であつた。

3) Hg<sup>203</sup>(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> を前述の 2 倍量、即ち 12,000,000 cpm/kg (水銀として 0.26 mg/kg)、又 1/5 倍量、即ち 1,200,000 cpm/kg (水銀として 0.026 mg/kg) の投与に於いても、腎臓及び肝臓の細胞各分割に於ける乾燥重量 1.0 mg 当りの蛋白結合水銀の比放射能値には順位の変動は認められなかつた。

4) 投与水銀の放射能値が少ない場合の方が多い場合よりも腎臓の Soluble Protein に於ける投与水銀の放射能値に対する乾燥重量 1.0 mg 当りの蛋白結合水銀の比放射能値は大なる値を示した。これに対し Nucleus, Mitochondria, Microsome に於いては投

与水銀の放射能値数に拘らず、これら細胞内顆粒の蛋白結合水銀の比放射能値はほとんど差異を認めなかつた。

稿を終るに臨み、終始懇切に御指導並びに御校閲を頂いた緒方正名教授に深謝いたします。又、御生

前厚き御指導を頂いた故大田原一祥教授の靈に謹謝の意を捧げます。

(本論文の要旨は第34回日本産業医学会総会に於いて発表した。)

## 文

- 1) Biondi, C.: Arch. Gewerbepath., 1, 754, 1931.
- 2) Frank, A. Patty.: Industrial Hygiene and Toxicology, II, Interscience Publishers. Inc., New York, 1947.
- 3) 及川富士雄: 労働科学, 31, 11, 1955.
- 4) 及川富士雄: 労働科学, 31, 137, 1955.
- 5) 鈴木継美: 産業医学, 1, 1, 1959.
- 6) 清水弥寿雄: 産業医学, 2, 3, 1960.
- 7) 入鹿山且朗, 藤木素士, 甲斐文朗, 近藤孝子: 日本衛生学雑誌, 16, 6, 1962.
- 8) 上田喜一: 日本の医学の1959年, 第15回日本医学会総会学会記録, 1, 320, 昭34.
- 9) 大田原一祥, 緒方正名他: 岡山医学会雑誌, 70, 11, 昭33.
- 10) 田坂定考: 臨床中毒学, 金原出版株式会社, 昭35.
- 11) Ludwig, E., u. Zillner, Wien. Klin. Wochr., 1889~1890.
- 12) Ullmann, Arch. f. Dermatol. u. Syphilis, 25 (Ergänzung Heft), 221, 1893.
- 13) Ahlmark, A.: Brit. J. Ind. Med., 5, 117, 1948.
- 14) Lundgren, K. D., & Swensson, A.: J. Ind. Hyg. & Toxicol., 31, 190, 1949.
- 15) Fitzhugh, D. G., et al.: A. M. A. Arch. Ind. Hyg. & Occup. Med., 2, 433, 1950.
- 16) Prickett, C. S., et al.: Proc. Soc. Expt. Biol. & Med., 73, 585, 1950.
- 17) Lipman, R. W., Findle, R. D., and Gillette, D.: Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 77, 68, 1951.
- 18) Friberg, L., Odeblad, E., and Forssman, S.: A. M. A. Arch. Ind. Health, 16, 163, 1957.
- 19) Patrica, W. D., Kenneth, G. S., and Joseph, G. H.: University of California press, Berkely and Los Angeles, 1957.
- 20) Bergstrand, A., Friberg, L., and Odeblad, E., A. M. A. Arch. Ind. Health, 17, 253, 1958.
- 21) Swensson, A., et al.: A. M. A. Arch. Ind.

## 献

- Health, 20, 432, 1959.
- 22) William, F. A., et al., Arch. Ind. Hyg. & Occp. Med., 7, 19, 1953.
- 23) 加藤義雄: 新潟医学雑誌, 70, 427, 昭31.
- 24) 松田勝一: 日本薬理学雑誌, 50, 238, 昭29.
- 25) 西連寺永康, 板井千年, 浦田行道, 鈴木智哲, 山野博可, 佐々木美子: Radioisotopes, 9, 33, 1960.
- 26) 三浦徳孝: 千葉医学会雑誌, 13, 2439, 昭10.
- 27) 小林喬三: 岡山医学会雑誌, 71, 7, II, 昭34.
- 28) Schneider, W. C.: J. Biol. Chem., 176, 259, 1948.
- 29) 山下久雄: アイソトープの医学的応用, 医学書院, 1954.
- 30) 阿南功一他: 医学領域に於ける生化学実験法, 医学書院, 1954.
- 31) Potter, V. R., Elvehjem, C.: J. Biol. Chem., 114, 495, 1936.
- 32) Potter V. R.: Manometric Techniques and Tissue Metabolism, 136, 1951.
- 33) Harman, J. W.: Experimental Cell Research, 1, 382, 1950.
- 34) 岩本隆雄: 医学のあゆみ, 28, 5, 1959.
- 35) Felix Haurowitz: Chemistry and Biology of Protein, Academic Press Inc., Publishers, New York, 1950.
- 36) Hans Neurath, & Kenneth Bailey: The Protein, 1, Part A. 1953.
- 37) 水島三一郎, 赤堀四郎: 蛋白化学, 2, 共立出版 昭29.
- 38) Hughes, W. L. Jr.: Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol., 14, 79, 1950.
- 39) Barron, E. S. G., & Kalnitsky, G.: Biochim. J., 41, 346, 1947.
- 40) 平出順吉郎: SH の進歩, 医学書院, 1954.
- 41) 伊藤 宏: 薬理学, 英光堂書店, 1962.
- 42) Haarman, J. W.: Biochem. Z., 314, 1, 1943.
- 43) 大田原一祥, 緒方正名, 只友淳雄: 日本衛生学雑誌, 15, 1, 1960.

## Experimental Studies on Mercury Poisoning with the Use of $\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$

### II. A study on the distribution of mercury combined with protein in the intracellular granules

By

Atsuo Tadatomo

Department of Public Health Okayama University Medical School

(Director: Prof. Masana Ogata)

#### Author's Abstract

This experiment was conducted in order to elucidate the distribution of mercury combined with protein in the intracellular granules in the case of mercury poisoning, one of the most important heavy-metal industrial poisonings that occur quite frequently. For this purpose, radio isotope  $\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$  was injected at varying concentration into the dorsal muscle of guinea pigs, and the distribution of mercury combined with protein in the intracellular granules of kidney and liver was studied. The results of observations were as follows.

1. Injected mercury has been found combined with protein of all cell fractions such as nucleus, mitochondria, microsomes, and soluble protein in kidney and liver.

2. Twenty-four hours after the injection of 6,000,000 c. p. m. /kg of  $\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$  (0.13 mg/kg of mercury), the radio activity of mercury combined with protein per 1.0 mg. of the intracellular granules of the kidney in dry weight is distributed in the descending order of soluble protein > microsomes > mitochondria > nucleus.

The distribution of mercury combined with protein in the liver cell fractions proves to be in the descending order of soluble protein > nucleus > microsomes > mitochondria.

3. A lesser dose of the radio active mercury injected, rather than a larger dose of it, shows a higher activity of mercury combined with protein per 1.0 mg of kidney soluble protein in dry weight against the activity of mercury injected. In contrast to this, in the nucleus, mitochondria, and microsomes the distribution of the activity of mercury combined with protein per 1.0 mg of dry weight hardly differ irrespective of the dose of mercury injected.

4. The changes in the order on the distribution of the radioactive mercury combined with protein in the intracellular granules of the kidney and the liver can not be observed by injection of 12,000,000 c. p. m. /kg of  $\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$ , (0.26 mg/kg of mercury) and 1,200,000 c. p. m. /kg of  $\text{Hg}^{203}(\text{NO}_3)_2$ , (0.026 mg/kg of mercury).

---