

## 生体内水銀の体外排泄に関する研究

Extracorporeal Excretion of Mercury from Mice Using Molybdenum Complex

愛甲 博美

岡山理科大学理学部動物学科

Hiromi Aikoh

Department of zoology, Faculty of Science, Okayama University of science

### Summary

Extracorporeal excretion of mercury by two molybdenum complexes was investigated using mice after injection of metallic mercury or mercuric ion. After injection of metallic mercury into mice, the mice that received the incomplete cubane-type sulfur-bridged nitrilotriacetato molybdenum (IV) complex ( $[\text{Mo}_3\text{S}_4(\text{Hnta})_3]^{2-}$ , referred to as the NTA complex) had the highest mercury content in their urine on the first day, followed by L-cysteine solution and then water. On the other hand, after injection of mercuric ion, the urinary mercury excretion from the mice that received various concentrations of the incomplete cubane-type sulfur-bridged cysteinato molybdenum (V) complex ( $[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2(\text{cys})_2]^{2-}$ , referred to as the CYS complex) showed a higher level than that of mice that received water (control group). The mercury content in the heart and lungs of the group that received the CYS complex solution decreased in comparison with that of the group that received the water. At the same time, the mercury level in the kidneys for the CYS complex solution group showed the tendency to increase relative to the group that received water.

### はじめに

近年、魚介類及び野生動物への水銀汚染が問題視され、人間の食生活にも少なからず影響が出始めていることが懸念されている。生体内に吸収・蓄積された水銀は、大部分が体外に排出されるが、水銀の大量摂取により一部が体内に留まり生態に悪影響を及ぼすことが考えられる<sup>1)</sup>。生体内に取り込まれた水銀の排出法には、数種のキレート剤が水銀の捕捉剤として治療に使われているが、種々の問題点も指摘されている。我々はこれまで数種類のモリブデン錯体を合成し、それぞれの錯体の特徴を利用した水銀の捕捉について検討してきた。その中で、不完全キューバン型硫黄架橋三核モリブデンアクア錯体(AQUA錯体と略す; $[\text{Mo}_3\text{S}_4(\text{H}_2\text{O})_9]^{4+}$ )<sup>2~3)</sup> およびこの錯体の改良型で中性溶液中でも安定なニトリロ三酢酸( $\text{H}_3\text{nta}$ )を配位子としたモリブデン錯体(NTA錯体と略す; $[\text{Mo}_3\text{S}_4(\text{Hnta})_3]^{2+}$ )<sup>4)</sup>の合成にも成功した。このNTA錯体溶液(緑色)の特徴は水銀と特異的に反応し、紫色に強く着色する点である。我々はこの特徴を利用することにより簡便な分光光度計を用いる水銀の定量法や生体内に吸収・蓄積された水銀の体外排出に応用してきた<sup>5~6)</sup>。更にはシステインを配位子とする硫黄架橋複核モリブデン錯体( $[\text{Na}_2[\text{Mo}_2\text{O}_2\text{S}_2(\text{L-cys})_2] \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ; CYS錯体と

略す)を合成し、水銀イオンや鉛イオンとの親和性が非常に強いことを確認した。このように種々の錯体の特徴を利用した研究において、金属水銀蒸気の曝露および水銀イオンの腹腔内注射したマウスの生体内に吸収・蓄積された水銀の体外排出に関して尿中への排出効果が得られるか検討してきた。また、これらの結果を将来的には野生動物からの水銀の体外排出に応用可能であるか検討中である。

これまで多くの硫黄架橋多核金属錯体を世界に先駆けて合成し、これらの興味深い性質を報告してきた。そこで、本稿はマウスの生体内に吸収・蓄積された水銀が、NTA錯体溶液およびCYS錯体溶液をマウスに経口投与した際、生体内水銀の尿中への体外排出の可能性について報告する。

### 水銀の酸化・還元

金属水銀は生体内に吸収されると、敏速に酸化されることが知られており、以前の研究において、カタラーゼが水銀の酸化取り込みに重要な役割を果たしていることを示した。また、Magosら<sup>7)</sup>は西洋ワサビペルオキシダーゼが過酸化水素による金属水銀の酸化を触媒していることを報告し、さらにカタラーゼによる水銀の酸化は基質としてエタノールの存在下でカタラーゼのペルオキシダーゼ作用として働

くかもしれないことを報告した<sup>8)</sup>。これらの事実を解明するために、過酸化水素の存在下で種々の鉄化合物による金属水銀の酸化速度について検討した。その結果、金属水銀の酸化速度は、カタラーゼ、フェリチン、メトヘモグロビン、ラクトペルオキシダーゼ、チトクローム C の順に減少した (表 1)。

表 1. カタラーゼ、チトクローム C、メトヘモグロビン、フェリチン、ラクトペルオキシダーゼによる金属水銀の酸化

Solution	Addition H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (3%)	Mercury uptake ( $\mu\text{g/ml}$ ; m $\pm$ SD)
Catalase	-	0.04 $\pm$ 0.01
	+	1.54 $\pm$ 0.13
Cytochrome C	-	0.03 $\pm$ 0.00
	+	0.18 $\pm$ 0.03
Methemoglobin	-	0.16 $\pm$ 0.02
	+	1.20 $\pm$ 0.07
Ferritin	-	0.33 $\pm$ 0.05
	+	1.14 $\pm$ 0.01
Lactoperoxidase	-	0.07 $\pm$ 0.01
	+	0.64 $\pm$ 0.10

これらの結果よりカタラーゼは過酸化水素の存在下で金属水銀の酸化に顕著な影響を示すとともに生体内に吸収された金属水銀がカタラーゼにより敏速に水銀イオンに酸化されることを示唆している。その他にもフェリチン、メトヘモグロビンおよびラクトペルオキシダーゼなどが金属水銀の酸化に関与することを認めた。

一方で、水銀イオンの金属水銀への還元におけるキサンチンオキシダーゼによる影響についても検討した (表 2)。その結果、キサンチ

表 2. キサンチン・キサンチンオキシダーゼ系による水銀イオンの還元

Agents	Reduction of mercury ( $\mu\text{g/ml}$ ; m $\pm$ SD)
X-XO	1.53 $\pm$ 0.09
X-XO-Cytochrome C	6.16 $\pm$ 1.49
X-Cytochrome C	0.40 $\pm$ 0.15
X-XO-NBT	1.65 $\pm$ 0.31
NADPH	0.17 $\pm$ 0.01
NADH	0.14 $\pm$ 0.02
ALH	0.23 $\pm$ 0.06
NLH	0.15 $\pm$ 0.04

NBT: Nitro blue tetrazolium, ALH: Acatalasiaemia liver homogenates, NLH: Normal liver homogenates

ンオキシダーゼの濃度が増加すると、水銀イオンの還元レベルも増加した。この結果は、水銀イオンがキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系によって生じたスーパーオキシドアニオンによって還元され、十分なキサンチンの存在下でスーパーオキシドアニオンの濃度がキサンチンオキシダーゼの濃度に比例していることを示している。また、スーパーオキシドアニオンとチトクローム C あるいはニトロブルーテトラゾリウム (NBT) の双方の存在下で水銀イオンの金属水銀への還元速度はキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系によっ

て生じたスーパーオキシドアニオンのそれよりも高いことを認めた。このことは、スーパーオキシドアニオンによりチトクローム C の酸化型が還元型に還元され、NBT はニトロブルーテトラゾリウムに還元されたことを示唆している。これらの結果を総括すると、金属水銀がカタラーゼの存在下で水銀イオンに酸化され、その水銀イオンはキサンチン・キサンチンオキシダーゼ系で生じたスーパーオキシドアニオンの存在下で金属水銀に還元されることを示唆している。

### 動脈血及び静脈血中金属水銀及び水銀イオン

過酸化水素の有無での正常及びアカタラセミアマウスの静脈血による水銀の酸化取り込みについて検討した。過酸化水素有無での正常マウスの静脈血を用いた水銀の酸化取り込み量は、過酸化水素の存在下で金属水銀量は減少するのに対して水銀イオン量は逆に増加した。過酸化水素無しでは金属水銀量は増加するが、水銀イオン量は減少する傾向を示した。また、過酸化水素無しでの総水銀量当たりの金属水銀比率は過酸化水素存在下の値と比べると、約 2 倍増加する傾向を示した。一方、アカタラセミアマウスにおいても正常マウスと同じような傾向を示した。これらの結果を考察すると、正常マウスとアカタラセミアマウスにおける金属水銀の比率はカタラーゼの作用による影響が大きいことを示唆している。また、これらの結果をさらに詳細に検討するために、血液を RBC と Plasma に分離し、それぞれに酸化取り込まれる水銀量を比較した結果、金属水銀量は RBC よりむしろ Plasma 中に多く存在し、水銀イオンは逆に RBC 中が若干多いことを認めた。同様に総水銀量当たりの金属水銀の比率は RBC より Plasma 中が高いことを認めた。これらの結果においては、正常マウスとアカタラセミアマウスの水銀の酸化取り込み量に差があることより、血中カタラーゼが金属水銀の酸化取り込みに影響を及ぼしていると考えられる。

これらの一連の実験結果を踏まえて、金属水銀蒸気を曝露した正常およびアカタラセミアマウス中の動脈血及び静脈血中金属水銀量および水銀イオン量を比較検討した。その結果を表 3 に示す。正常およびアカタラセミアマウスの動脈血中金属水銀量はいずれも静脈血中のそれよりも約 2 倍高い値が得られた。このことは金属水銀蒸気に曝露された両マウスとも動脈血中に吸収された金属水銀が静脈血中よりも多量に存在し、血液・脳関門および血液・肝

臓器門を容易に通過し、移送されることを示唆している。

表 3. 金属水銀蒸気を曝露した正常およびアカタラセミアマウスの動脈及び静脈血中の水銀量

Species		Mercury uptake		
		Hg <sup>0</sup> (µg/ml; m ± SD)	Hg <sup>2+</sup> (µg/ml; m ± SD)	Hg <sup>0</sup> /Total (%; m ± SD)
Arterial blood	N	0.65 ± 0.05	46.48 ± 3.57	1.63 ± 0.12
	A	0.97 ± 0.10	18.55 ± 3.32	6.30 ± 1.92
Venous blood	N			
	W.B.	0.32 ± 0.02	47.90 ± 2.97	0.66 ± 0.01
	RBC	0.17 ± 0.01	20.30 ± 0.97	0.83 ± 0.01
	Plasma	0.15 ± 0.01	27.60 ± 2.00	0.54 ± 0.01
	RBC/Plasma	1.13 ± 0.01	0.74 ± 0.02	
	A			
	W.B.	0.46 ± 0.01	35.83 ± 2.13	1.27 ± 0.05
	RBC	0.24 ± 0.02	16.25 ± 0.59	1.45 ± 0.05
Plasma	0.22 ± 0.01	19.90 ± 1.55	1.12 ± 0.12	
RBC/Plasma	1.10 ± 0.11	0.84 ± 0.03		

W.B.: Whole blood (RBC+Plasma)

## 臓器中の水銀分布

金属水銀蒸気を曝露した正常およびアカタラセミアマウスの臓器中水銀分布について検討した。その結果を図 1 に示す。アカタラセミア

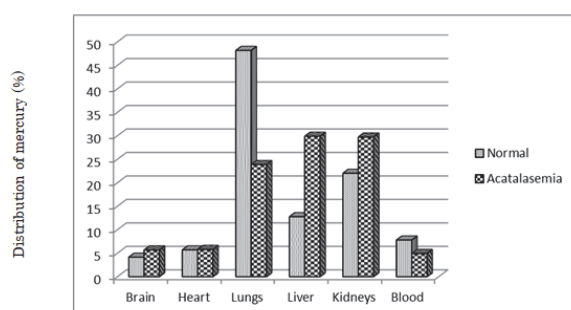


図 1. 金属水銀蒸気を曝露した正常およびアカタラセミアマウスの臓器中水銀分布

アマウスの肺臓と血液中水銀量が正常マウスに比べて減少したが、脳、肝臓中水銀量は逆に増加した。このことはアカタラセミアマウスにおける水銀の brain/blood および liver/blood ratio が正常マウスのこれらより有意に高いことと関連があると思われる。これらの結果は血中カタラーゼによる水銀酸化が影響しており、酸化されずに残っている一部の金属水銀が血液-脳関門および血液-肝臓関門を容易に通過したことを示唆している。このように臓器中水銀分布の偏りがあることは、金属水銀から水銀イオンへの酸化におけるカタラーゼの影響が大きいと思われる。最終的には、正常マウスおよびアカタラセミアマウスとも時間経過とともに水銀の標的臓器でもある腎臓に移送され、尿中に排出されることが考えられる。

## NTA 錯体溶液を用いる尿中への水銀排出

生体内に吸収・蓄積された水銀の体外排出を敏速にするため、金属水銀との親和性の高い錯体を用い、生体内水銀の体外排出について検討した。金属水銀蒸気を曝露したマウスに NTA 錯体溶液、L-システイン溶液を投与した際の尿

中水銀量について水（コントロール）を投与したマウスと比較検討した。その結果を図 2 に示す。その結果、水を投与したマウスでは 1~2

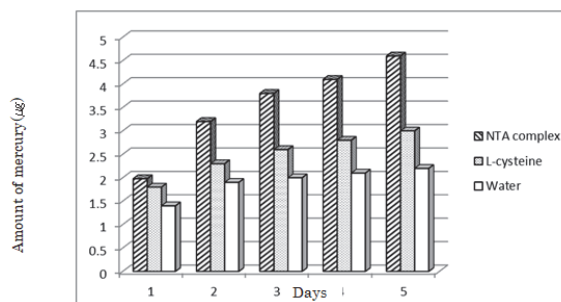


図 2. 金属水銀蒸気を曝露したマウスから排出した尿中水銀量

日まではわずかながら尿中への水銀排出が見られたが、3日目以降ではほとんど確認することは出来なかった。また、L-システイン溶液を投与したマウスでは、水投与に比べて 1.4 倍ほど尿中への水銀排出量が増加した。次に NTA 錯体溶液を投与したマウスでは、2日目以降尿中への水銀排出量は増加し、5日目までの尿中累積水銀量を水、L-システイン溶液のそれと比較すると、それぞれ 2.1 倍、1.5 倍程度 NTA 錯体溶液を投与したマウスからの尿中水銀量が増加することを認めた。このことは NTA 錯体溶液が生体内に吸収された金属水銀を捕獲し、尿中への水銀排出量を敏速に促進させる効果があることを示唆している。

## 経時的臓器中水銀分布

金属水銀蒸気を曝露したマウスの経時的臓器中水銀分布について検討した。その結果を図 3~5 に示す。金属水銀蒸気の曝露直後では、図 3 に見られるように肺臓中水銀量が最も高く、

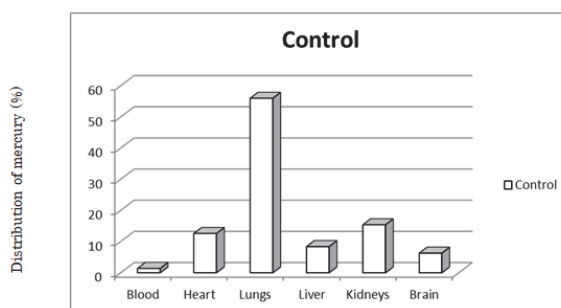


図 3. 金属水銀蒸気を曝露したマウスの臓器中水銀分布

次に腎臓、心臓の順であった。これらのマウスに NTA 錯体溶液、L-システイン溶液、水（コントロール）を投与すると、曝露後 1 日目にはいずれのマウスでも肺臓中水銀量が減少し、逆に腎臓中水銀量が増加した。腎臓中水銀量が最も高いのはコントロールで、次に L-システイン溶液、NTA 錯体溶液の順であった（図 4）。

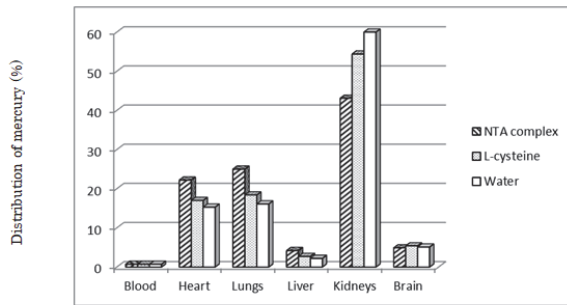


図 4. 金属水銀蒸気の曝露 1 日後の臓器中水銀分布

一方、心臓中水銀量は NTA 錯体溶液を投与したマウスが多く、次に L-システイン溶液、水の順であった。しかしながら、5 日目以降では心臓および腎臓中水銀量は 1 日目とは逆の結果が認められた (図 5)。このことは各試料を

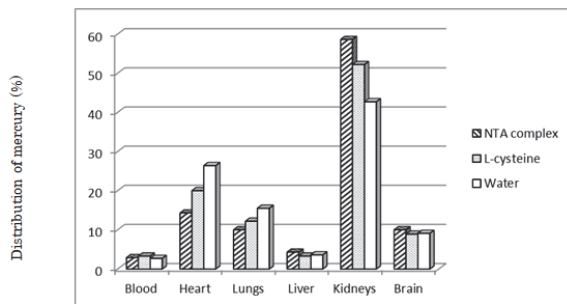


図 5. 金属水銀蒸気の曝露 5 日後の臓器中水銀分布

投与したマウスにおける尿中水銀量を比較した際に、5 日目において NTA 錯体溶液を投与したマウスにおける尿中水銀量が最も高く、次に L-システイン溶液、水の順であったこのように腎臓中水銀量が増加しても尿中への敏速な水銀排出と比例しないことが認められた。これらの結果を総括すると、NTA 錯体溶液を投与したマウスでは各臓器中の水銀を捕獲し、腎臓に移送し、尿中へ敏速に排出する効果があることを示唆している。

### CYS 錯体溶液による尿中水銀と臓器中水銀分布

金属水銀との親和性の高い NTA 錯体溶液による水銀の体外排出を試み、尿中水銀の排出量を促進させる効果があることを確認した。次に、水銀イオンとの親和性の高い CYS 錯体溶液による生体内水銀の体外排出について、水銀イオンを腹腔内注射したマウスを用いてその効果を検討した。その結果を図 6 に示す。水銀イオンを腹腔内注射したマウスに CYS 錯体溶液を投与すると、水を投与したマウスに比べて 1 日目から尿中水銀の排出量が増加し、8 日間の尿中累積水銀量では水と比べて約 2 倍増加することを認めた。このように生体内に吸収蓄積された水銀が CYS 錯体溶液により捕獲され、

腎臓中へ移送されることを示唆している。この結果は金属水銀蒸気を曝露したマウスにおいても同様の効果があることを確認している。

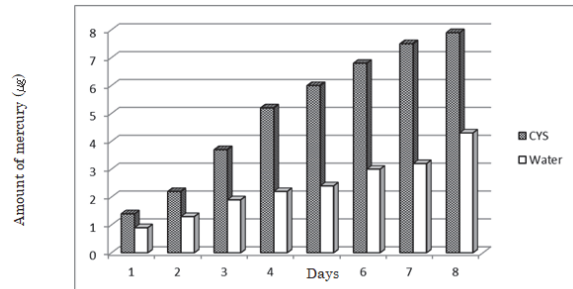


図 6. 水銀イオンを腹腔内注射したマウスから排出された尿中水銀量

同様に水銀イオンを腹腔内注射したマウスの臓器中水銀分布について検討した。水銀イオン注射 1 日後の結果を図 7 に示す。CYS 錯体

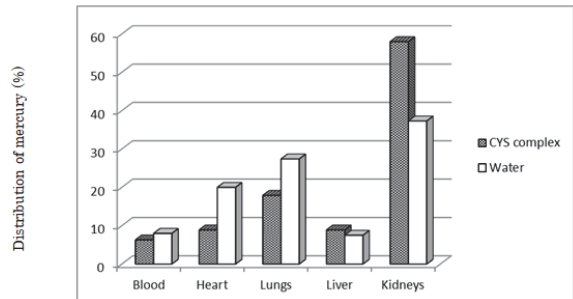


図 7. 水銀イオンを腹腔内注射したマウスの臓器中水銀分布

溶液を投与したマウスでは腎臓中水銀量が最も高く、次に肺臓、心臓、肝臓、血液の順であった。一方、水を投与したマウスでは、CYS 錯体溶液を投与したマウスに比べて腎臓中水銀量が低く、肺臓、心臓、血液中水銀量が高いことが認められた。このことは CYS 錯体溶液が各臓器中の水銀を捕獲し、水銀が敏速に腎臓に移送されたことを示唆している。これらの結果は上記の尿中水銀におけるマウスの累積水銀量が増加したと密接な関連性があると思われる。

### 参考文献

- 1) T.W.Clarkson, *et.al.*, **Biol. Neonate**, 21, 239(1972).
- 2) H. Aikoh and T. Shibahara, **Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR**, 22, 187(1990).
- 3) H.Aikoh and T. Shibahara, **Analyt.**, 118, 1329(1993).
- 4) T. Shibahara, *et.al.*, **Inorg. Chem. Commun.**, 8, 777(2005).
- 5) H.Aikoh and T. Shibahara, **Physiol. Chem. Phys. & Med. NMR**, 34, 83(2002).
- 6) H.Aikoh and T. Shibahara, **J. Occup. Health**, 44, 334(2002).

7) L. Magos, S. Halbach, T. W. Clarkson, *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1373(1978).

8) L. Magos, T. W. Clarkson, M. R. Greenwood, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **26**, 160(1973).