

# 金属水銀の取り込みに対するカタラーゼの役割に関する研究

## 第 3 報

### 酵表反応により生成する過酸化水素と カタラーゼによる金属水銀の酸化

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

劔 持 堅 志

（昭和59年2月25日受稿）

**Key words:** oxidation of mercury by catalase,  
glucose oxidase,  
D-aminoacid oxidase,  
superoxide dismutase,  
xanthine oxidase

## 緒 言

金属水銀 ( $\text{Hg}^0$ ) は経氣的に吸収され、生体内で酸化される。この  $\text{Hg}^0$  の生体内酸化にカタラーゼが関与していることは、最初 Kudsk が報告した<sup>1-3)</sup>。さらに Magos<sup>4-5)</sup>らは3-アミノ-1, 2, 4-トリアゾールを用いた実験により、Ogata<sup>6-7)</sup>らはアカタラセミアマウス及びヒトアカタラセミアを用いた実験により、この事実を証明した。

筆者は前報<sup>8-9)</sup>において、各種動物赤血球の  $\text{Hg}^0$  取り込み量とカタラーゼ活性の間に併行関係が成立することを証明した。さらにカタラーゼによる  $\text{Hg}^0$  の取り込みは、カタラーゼ活性阻害剤のシアン、アジ化ナトリウム及び3-アミノ-1, 2, 4-トリアゾールにより阻害されるとともに、エチルアルコール及びメチルアルコールによっても阻害されることを報告した。またカタラーゼと同じヘム蛋白質であるメトヘモグロビン及びチトクローム c- $\text{H}_2\text{O}_2$  系においても  $\text{Hg}^0$  の酸化が認められること、更に細胞内顆粒であるミトコンドリア、マイクロボディ（ペルオキシゾーム）及びミクロゾームにおいても  $\text{Hg}^0$  の酸化が生じることを報告した<sup>8-9)</sup>。筆者はこの中で、これらの酸化系がいずれも過酸化水

素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) を基質とすること、またカタラーゼによる  $\text{Hg}^0$  の酸化がアルコール類により抑制されることから、カタラーゼの金属水銀酸化作用はカタラーゼのペルオキシダーゼ作用に起因すると考えられると報告した。

今回は、生体内における過酸化水素生成系に着目して、グルコースオキシダーゼ (GOX)、D-アミノ酸酸化酵素 (D-AOX)、キサンチンオキシダーゼ (XO) ~スーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 系等の酵素系を用いて、カタラーゼと酵素系により生成する  $\text{H}_2\text{O}_2$  とによる  $\text{Hg}^0$  の酸化について検討したので報告する。

## 実験材料と実験方法

### 1. 実験材料

D-AOX (from Hog Kidney), XO (Grade VI from Milk), SOD (TYPE I from Bovine blood) 及びカタラーゼ (Beef liver) はいずれも Sigma 社製を使用し、GOX は東洋紡製 (TYPE VI) を使用した。またその他の試薬は全て特級を使用した。

血液試料は健康人の血液（ヘパリン処理）を遠心分離（3000 rpm x 10分）し、血漿を得た後、赤血球は Krebs-Ringer リン酸緩衝液 (KRPB, pH 7.4) で3回洗浄し実験に供した。また溶血

液は赤血球を等量の精製水で溶血し、遠心分離後、その上清を使用した。

## 2. 試料液の調製

GOX~カタラーゼ系：終濃度50 mMのグルコース、1 mMのEDTAを含むM/15リン酸緩衝液(pH 7.4) 3 mlにGOXを0.001~10  $\mu$ g及びカタラーゼを100  $\mu$ g加え実験に供した。

GOX~赤血球系：終濃度50 mMのグルコース及び終濃度3.3 gヘモグロビン(Hb)/dlの赤血球を含む溶液3 mlにGOX 0.001~1  $\mu$ gを添加し実験に供した。

D-AOX~カタラーゼ系：終濃度0.36%のD-アラニン及び1 mMのEDTAを含むM/15リン酸緩衝液(pH 7.4) 3 mlにD-AOX, 0.001~10  $\mu$ gを添加し実験に供した。

キサンチン~XO~カタラーゼ系：終濃度0.3 mMのキサンチン及び1 mMのEDTAを含むM/15リン酸緩衝液(pH 8.5) 3 mlにXO 500  $\mu$ g, SOD 500  $\mu$ g及びカタラーゼ100  $\mu$ gを添加し実験に供した。

キサンチン~XO血液系：血液試料を適量のKRPB溶液で希釈し、この溶液3 mlに終濃度0.3 mMのキサンチン及び100  $\mu$ gのXOを加え実験に供した。

## 3. インキュベート法

容量約15 mlのワールブルグフラスコのMain Chamberに試料液3 mlを入れ、Center Wellに必要な応じてH<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0.1 mlを加え、密栓をして37°Cで90分間振とうしながらインキュベートした。

## 4. 測定法

全水銀の測定：試料液0.1~1 mlを過マンガン酸カリウム溶液により湿式灰化した後、還元気化原子吸光法により測定した。

スーパーオキシドアニオン(O<sub>2</sub><sup>-</sup>)の測定：NBT<sup>10)</sup>法により測定した。

蛋白質の測定：Biuret<sup>11)</sup>法またはLowry<sup>12)</sup>法により測定した。

ヘモグロビン(Hb)量の測定：シアンメトヘモグロビン法により測定した。

カタラーゼ活性の測定：過ホウ素酸法<sup>13)</sup>により測定した。

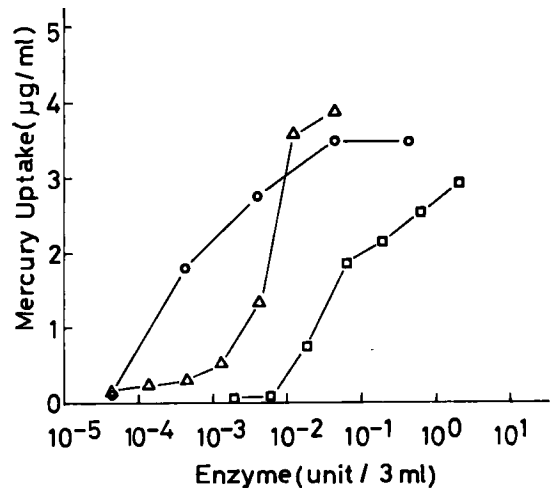


Fig. 1. *In vitro* metallic mercury oxidation by catalase and human erythrocyte in glucose-glucose oxidase system and D-alanine-D-amino acid oxidase system

○ Glucose-Glucose oxidase-Catalase system

△ Glucose-Glucose oxidase-Erythrocyte system

□ D-alanine-D-Amino acid oxidase-Catalase system

\* Glucose oxidase unit : one unit = 10  $\mu$ l O<sub>2</sub>/min

\* D-Amino acid oxidase unit : 1  $\mu$ mol D-alanine to pyruvate/min

## 結 果

### 1. グルコース~GOX~カタラーゼ系によるHg<sup>0</sup>の酸化取り込み

グルコース~GOX系により生成するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と肝結晶カタラーゼ酵素液による酸化取り込みを検討した(図1)。GOX濃度が5×10<sup>-5</sup>unit/反応容量(3 ml)付近までは、Hg<sup>0</sup>の取り込みは増加しなかったが、それ以上の濃度においては、酵素量の対数的な増加に対して、直線的なHg<sup>0</sup>の取り込みの増加が認められた。そして、GOX濃度0.05 unit/反応容量(3 ml)付近で、Hgの取り込みは3.5  $\mu$ g/mlに達し、それ以上の濃度ではカタラーゼによる取り込みは飽和する傾向を示した。なおGOXが存在しない反応系における取り込みは0.03±0.01  $\mu$ g/mlであり、カタラーゼ~グルコース系による取り込みは認められなかった。

### 2. グルコース~GOX~赤血球系によるHg<sup>0</sup>

の酸化取り込み

グルコース～GOXにより生成するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と赤血球によるHg<sup>0</sup>の酸化取り込みを検討した(図1)。GOX濃度が10<sup>-3</sup> unit/反応容量(3ml)付近まではHg<sup>0</sup>の取り込みは増加しなかったが、それ以上の濃度においては、酵素量の対数的な増加に対して、直線的なHg<sup>0</sup>の取り込みの増加が認められた。そして、GOX濃度0.05 unit/反応容量(3ml)付近で、Hg<sup>0</sup>の取り込みは4 μg/mlに達し、それ以上の濃度ではHgの取り込みは飽和する傾向を示した。なお同一条件でH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を気相から供給した場合のHg<sup>0</sup>の取り込み量は2.3±0.3 μg/mlであり、GOXにより生成されるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>はHg<sup>0</sup>の酸化に十分な濃度に達していると推定された。

3. D-アラニン～D-AOX～カタラーゼ系によるHg<sup>0</sup>の酸化取り込み

肝細胞内に存在するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>生成系であるD-アラニン～D-AOX系と肝結晶カタラーゼ酵素液によるHg<sup>0</sup>の酸化取り込みを検討した(図1)。この系では、D-AOX濃度が0.01 unit/反応容量(3ml)付近から、D-AOX濃度の対数的増加に対して、Hg<sup>0</sup>の取り込みが直線的に増加した。なおカタラーゼを除去した系での取り込みは0.04±0.01 μg/mlであり、D-アラニンを除去した系の取り込みは0.04±0.01 μg/mlであるため、D-AOXまたはD-アラニン自体により取り込みは認められなかった。したがって、このHg<sup>0</sup>の取り込みは、D-アラニン～D-AOXにより生じるH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>とカタラーゼによる作用と考えられる。

4. キサンチン～XO～SOD～カタラーゼ系によるHg<sup>0</sup>の酸化取り込み

キサンチン～XO系により生成するO<sub>2</sub>と、これにSODを添加することにより生成するH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>と肝結晶カタラーゼ酵素液によるHg<sup>0</sup>の酸化取り込みを検討した(表1)。キサンチン溶液はほとんどHg<sup>0</sup>を取り込まない(0.067±0.010 μg/ml)が、これにXOを添加するとごくわずかの取り込みの増加(0.133±0.006 μg/ml)が生じた。この系に対してSODを添加(O<sub>2</sub>  $\xrightarrow{SOD}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)すると、取り込みは抑制(0.045±0.007 μg/ml)された。このためキサンチン～XO系で生じる取り込みはO<sub>2</sub>の作用と考えられるため、現在検

Table 1. *In vitro* metallic mercury oxidation by xantine-xanthine oxidase-catalase system

XO	SOD	Catalase	Hg(μg/ml, m ± SD)
-	-	-	0.039 ± 0.010
-	+	+	0.067 ± 0.010
+	-	-	0.133 ± 0.006
+	+	-	0.045 ± 0.007
+	+	+	1.007 ± 0.146
-	-	+(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )	1.075 ± 0.232

2mM xanthine solution (pH8.5), XO; 0.044u,\* SOD; 0.5mg, Catalase; 0.1mg, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 3%  
\* Xanthine oxidase unit: 1 unit = 1 μmol Xanthine to Urate/min

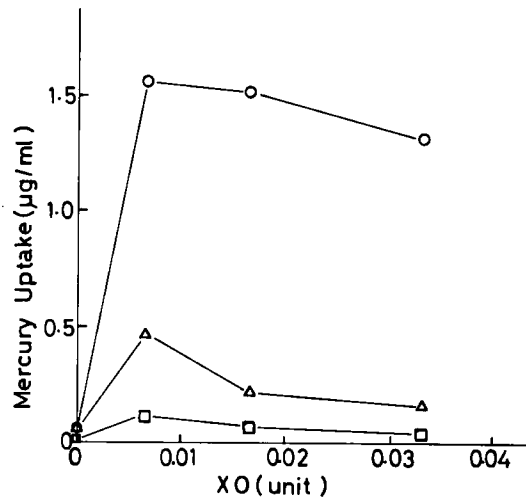


Fig. 2. Effect of xanthine oxidase concentration on the mercury uptake by human hemolysate, erythrocytes and plasm.

\* O Hemolysate (2.5g. Hb/dL, 3 ml)  
△ Erythrocytes (2.5g. Hb/dL, 3 ml)  
□ Plasm (2.5g. protein/dL, 3 ml)

\*\* Xanthine oxidase unit : 1 unit = 1 μmol  
1 μmol Xanthine to urate/min.

討中である。更に、この系にSOD及びカタラーゼを添加(キサンチン  $\xrightarrow{XO} O_2 \xrightarrow{SOD} H_2O_2 \xrightarrow{カタラーゼ} H_2O_2 + \frac{1}{2} O_2$ )すると急激にHg<sup>0</sup>の取り込み(1.007±0.146 μg/ml)が認められ、この値は気相中からH<sub>2</sub>O<sub>2</sub>を供給した場合とほぼ同じ水準に達した。そして、この系からXOを除去するとHg<sup>0</sup>の取り込みはほぼ完全に抑制(0.067±0.010 μg/ml)された。

### 5. キサンチン～XO～血液系における $Hg^0$ の酸化取り込み

赤血球内に生成した  $O_2^-$  と内在する SOD により生成する  $H_2O_2$  によって血液への  $Hg^0$  の酸化取り込みが生ずるか否かを検討した (図2)。試料として、血漿と SOD、カタラーゼを内在する赤血球及び溶血液を用い、キサンチン～XO 系により  $O_2^-$  を発生させた。溶血液及び赤血球浮遊液は、XO を添加しない状態でも若干の  $Hg^0$  の取り込みを示すが、約 0.07 unit の XO の添加により急激な  $Hg^0$  の取り込みを示した。しかし、更に XO の濃度を増加させた場合では、その取り込みは逆に減少する傾向を示した。また血漿も同様な傾向を示した。同一 XO 濃度における  $Hg$  の取り込み能力は溶血液 > 赤血球浮遊液 > 血漿の順に減少し、 $O_2^- \xrightarrow[2H^+]{SOD} H_2O_2 \xrightarrow{\text{カタラーゼ}} H_2O + \frac{1}{2} O_2$  反応における SOD 量及びカタラーゼ量の差異、また赤血球膜の存在が  $Hg^0$  の酸化に影響を及ぼしていることが示唆された。

### 考 察

前報<sup>9)</sup>において、 $Hg^0$  の酸化がカタラーゼ以外にもメトヘモグロビン及びチトクローム c 等のヘム蛋白質によっても生ずること、そしてその酸化取り込みには  $H_2O_2$  の存在が不可欠であることを報告した。生体内における  $H_2O_2$  生成系としては、マイクロボディにおける D-AOX 及びウリカーゼ等の酸化酵素<sup>26-27)</sup>、ミトコンドリア、マクロファージ、白血球及び赤血球等における  $O_2^-$  ～SOD 系<sup>14-25)</sup> による発生があり、 $H_2O_2$  は生体内で連続的に供給されていると考えられる。今回の実験ではグルコース～GOX 系、D-アラニン～D-AOX 系及びキサンチン～XO～SOD 系を選び、生体内に近い条件で  $Hg^0$  の酸化取り込みを検討し、従来の  $H_2O_2$  を気相中から供給した場合の成績と比較した。その結果、いずれの場合も、 $H_2O_2$  生成酵素の量と併行した  $Hg^0$  の酸化取り込みを示した。このことは、生体内における  $Hg^0$  の酸化過程において、カタラーゼ活性度の相違が  $Hg^0$  の酸化取り込みに影響を与えていると同時に、生体内での酵素による  $H_2O_2$  の生成速度が  $Hg^0$  の酸化取り込み

に影響を与え得ることを示唆している。

表1のキサンチン～XOD系において若干の  $Hg^0$  の酸化取り込みが認められ、さらにこの取り込みが SOD の添加により抑制される事実、そして図2のキサンチン～XOD～溶血液系において、XOD の濃度の増加に従って  $Hg^0$  の取り込み量が最高位に達した後に減少する傾向を示すことは、系内で生成している  $O_2^-$ 、そして  $O_2^-$  と EDTA～鉄キレートにより生成すると報告<sup>22-24)</sup>されているヒドロキシラジカル ( $OH$ ) が水銀イオンまたは  $Hg^0$  を還元または酸化している可能性があり、今後の検討を要する。

### 結 論

酵素系により連続的に発生させた  $H_2O_2$  とカタラーゼによる  $Hg^0$  の酸化取り込みを検討し、次の成績を得た。

1) グルコース～GOX 系により生成した  $H_2O_2$  と赤血球及び肝結晶カタラーゼ酵素液による  $Hg^0$  の酸化取り込みが認められた。またその取り込みは、GOX 濃度の対数的増加に併行して増加した。

2) D-アラニン～D-AOX 系においても、D-AOX 濃度の対数的増加に併行した  $Hg^0$  の酸化取り込みが認められた。

3) 生体内における主要な  $H_2O_2$  生成系と考えられている  $O_2^-$ ～SOD 系により生成する  $H_2O_2$  と肝結晶カタラーゼ酵素液による酸化取り込みが認められた。

4) キサンチン～XO 系により生成した  $O_2^-$  と溶血液、赤血球浮遊液及び血漿による  $Hg^0$  の酸化取り込みが認められ、生体内で生成した  $O_2^-$  が  $Hg^0$  の酸化取り込みに作用する可能性が示された。

以上の結果、生体内における  $Hg^0$  の酸化取り込みは、生体のカタラーゼ活性のみならず、生体内における  $H_2O_2$  生成量に依存している可能性を見出した。

### 謝 辞

本論文を撰筆するに当たり、御懇切なる御指導並びに御校閲を賜った恩師緒方正名教授に深甚の謝意を表します。

## 文 献

1. Kudsk, F.N.: The influence of ethyl alcohol on the adsorption of mercury vapor from the lungs in man. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **23**, 263—274, 1965.
2. Kudsk, F.N.: Factors influencing the *in vitro* uptake of mercury vapor in blood. *Acta Pharmacol. Toxicol.* **27**, 161—172, 1969.
3. Kudsk, F.N.: Biological oxidation of elemental mercury. In *Mercury, Mercurials and Mercaptans*, ed. M.M. Miller and T.W. Clarkson, Thomas, Springfield, Illinois, pp.355—375, 1972.
4. Magos, L., Sugata, Y and Clarkson, T.W.: Effect of 3-Amino-1, 2, 4-Triazole on mercury uptake by *in vitro* human blood samples and whole rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **28**, 367—373, 1974.
5. Magos, L., Halbach, S. and Clarkson, T.W.: Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. *Biochem. Pharmacol.* **27**, 1373—1377, 1978.
6. Ogata, M. and Ikeda, M.: Mercury uptake by acatalasemia mice and their erythrocytes, lung and liver homogenate. *Int. Arch. Occup. Health.* **41**, 87—93, 1978.
7. Ogata, M., Sugata, Y. and Ikeda, M.: *In vitro* mercury uptake by human acatalasemic erythrocytes. *Arch. Environ. Health.* **34**, 218—221, 1979.
8. 剣持堅志: 金属水銀の取り込みに対するカタラーゼの役割に関する研究 第1報 カタラーゼ活性の異なる動物赤血球の金属水銀の取り込みと粗赤血球カタラーゼ液により取り込み. 岡山医学会雑誌, **92**, 999—1005, 1980.
9. 剣持堅志: 金属水銀の取り込みに対するカタラーゼの役割に関する研究 第2報 ラット肝遊離細胞, ホモジネート, 細胞内顆粒, ヘム蛋白質及び3価の鉄イオンによる金属水銀の取り込みとエチルアルコール及びメチルアルコールの作用. 岡山医学会雑誌, **93**, 835—843, 1981.
10. 今成登志男, 広田元子, 宮崎元一, 早川和一, 田村善蔵: Superoxide dismutase 活性測定法の改良. 医学のあゆみ, **101**, 496—497, 1978.
11. 瓜谷郁三, 志村憲助, 中村道徳, 船津 勝編: 生物化学実験法 蛋白質の定量法. 東京大学出版会, 東京, pp.65—85, 1971.
12. Lowry, O.H., Rosebrough, C.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Follin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265—275, 1951.
13. Feinstein, R.N.: Perborate as substrate in a new assay of catalase. *J. Biol. Chem.* **180**, 1197—1202, 1949.
14. Maccord, J.M. and Fridovich, I.: Superoxide Dismutase. *J. Biol. Chem.* **244**, 6049—6055, 1969.
15. Fridovich, I.: Superoxide Dismutase. *Annual Rev. Biochem.* **44**, 147—159, 1975.
16. Mccord, J.M.: Free radicals and inflammation: protection of synovial fluid dy superoxide dismutase. *Science* **185**, 529—531, 1975.
17. Beaumchamp, C. and Fridovich, I.: Superoxide dismutase: Improved Assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochem.* **44**, 276—287, 1971.
18. Winterbourn, C.C., Hawkins, R.E., Brian, M. and Carrell, R.W.: The estimation of red cell superoxide dismutase activity. *J. Lab. Clin. Med.* **85**, 337—341, 1975.
19. Kellogg, E.W. and Fridovich, I.: Superoxide, hydrogen peroxide, and Singlet oxygen in lipid peroxidation by a xanthine oxidase system. *J. Biol. Chem.* **250**, 8812—8817, 1975.
20. Muraoka, S.: Studies on xanthine oxidase. *Biochem. Biophys. Acta* **73**, 17—26, 1963.
21. Weisigner, R.A. and Fridovich, I.: Mitochondrial superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* **248**, 4793—4796, 1973.

22. 大柳善彦：スーパーオキシドと医学。共立出版，東京，pp.1—52，1981.
23. 水上茂樹：赤血球の生化学。東京大学出版会，東京，pp.118—132，1981.
24. 水上茂樹，柿沼カツ子：白血球と食作用。講談社，東京，pp.82—148，1981.
25. Fong, K.L. and Mccay, P.B.: Evidence for superoxide-dependent reduction of  $Fe^{3+}$  and its role in enzyme-generated hydroxical radical formation. *Chem. Biol. Interaction* **15**, 77—89, 1976.
26. Duve, C.D., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F.: Tissue fractionation studies 6. Intercellular distribution patterns of enzymes in rat liver-tissue. *Biochem. J.* **60**, 604—617, 1955.
27. 藤原史子：ラット及びマウス肝細胞内軽系粒体画分諸酵素の顆粒外遊出に及ぼす諸種分画溶液及び特にウリカーゼ含有顆粒について。札幌医誌，**26**，102—113，1964.
28. Bentley, R.: *Method in Enzymology vol I*, ed. Colowick, S.P. and N.O., Kaplan, Academic Press Inc, New York, pp.340—345, 1955.
29. Buran, K.: *Methods in Enzymology vol II*, ed. Colowick, S.P. and N.O., Kaplan. Academic Press Inc, New York, pp.199—204, 1955.

**Study on the role of catalase for uptake of metallic mercury**  
**Part 3 *In vitro* oxidation of metallic mercury by catalase and**  
**hydrogen peroxide generated by several oxidase system**

**Katashi KENMOTSU**

**Department of Public Health, Okayama University Medical School**

**(Director: Prof. M. Ogata)**

*In vitro* oxidation of metallic mercury by catalase and hydrogen peroxide generated by the glucose-glucose oxidase system, D-alanine-D-amino acid oxidase system and xanthine-xanthine oxidase-superoxide dismutase system was investigated.

*In vitro* oxidation of metallic mercury by catalase and hydrogen peroxide generated by the reaction with glucose and glucose oxidase was observed in erythrocytes and crystalline beef liver catalase solution. The uptake depended on the concentration of glucose oxidase and nearly logarithmically increased with the increasing concentration of glucose oxidase. Similar oxidation of metallic mercury was observed in the solution of catalase, D-amino acid oxidase and D-alanine. The uptake also nearly logarithmically increased with increasing concentration of D-amino acid oxidase. *In vitro* oxidation of metallic mercury by catalase and hydrogen peroxide generated by the reaction system xanthine, xanthine oxidase and superoxide dismutase was observed. Oxidation of metallic mercury similar to that in the xanthine-xanthine oxidase system was observed in the solution of human plasma, hemolysate and erythrocytes containing superoxide dismutase and catalase.

These results suggest that hydrogen peroxidase generated by oxidase has an important role in the uptake of metallic mercury vapor.