

岡山医学会雑誌

第93巻9,10合併号(第1042,1043号)

昭和56年10月30日発行

金属水銀のカタラーゼによる 取り込みに関する研究

第2報

ラット肝の遊離細胞, 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56年6月30日受稿)

Key words: Catalase, Cytochrom C,
Methemoglobin, Cell Components
Dissociated Cell,

緒 言

金属水銀(Hg^0)は広く工業的に使用され, 作業環境中に放出されている¹⁾. さらに環境大気中においてもその存在²⁾が知られている. Hg^0 は経氣的に生体に吸収され, 酸化された後, 尿中に排泄される. この生体内における酸化にカタラーゼが関与していることは, 最初 Kudsk により報告³⁻⁵⁾された.

筆者は前報⁶⁾において, 各種動物の赤血球のカタラーゼ活性と Hg^0 の取り込み量との間に平行関係が成立すること, 精製した赤血球カタラーゼ液においても Hg^0 の取り込みが生じ, この取り込みは, シアン化カリウム(KCN), アジ化ナトリウム(NaN_3)及び3-アミノ-1,

2, 4-トリアゾール(AT)などのカタラーゼ活性阻害剤の添加により抑制されることを報告した.

今回は, 細胞構造の Hg^0 の取り込みに対する影響を検討する目的で, ラット肝のホモジネート, 遊離細胞及び細胞内顆粒〔マイクロボディー(microbody)分画, ミトコンドリア(mitochondria)分画, ミクロゾーム(microsome)分画〕を調製し, Hg^0 の取り込みを比較検討した. また生体内において Hg^0 の取り込みを抑制すると言われているエチルアルコール⁷⁻⁸⁾の作用を検討するとともに, メチルアルコールの作用についても検討を行なった. さらにカタラーゼ以外の物質による Hg^0 の酸化の可能性を検討する目的で, チトクロームC, メトヘモグロビ

ン、ヘマチンなどの3価の鉄を有するヘム蛋白質及び3価の鉄イオンによる Hg^0 の取り込みについても検討を行なったのでここに報告する。

実験材料及び実験方法

1. 実験材料

体重200 g前後のウイスター系ラットの肝臓を用いた。

チトクロームC (Horse Heart), カタラーゼ (Beef Liver), ヘモグロビン (Human), ヘマチン (Bovine Blood)はいずれもシグマ社製を使用した。

その他の試薬は全て特級を使用した。

2. 試料液の調製

肝の遊離細胞は Rappaport らの方法⁹⁾を用いて調製し、蛋白量を3.75mg/mlに調整して実験に供した。

ホモジネートは、10倍量の Krebs-Ringer 磷酸緩衝液 (pH7.4) を加え、テフロンホモジナイザーを用いてホモジナイズした後、蛋白量を3.77mg/mlに調整して実験に供した。

マイクロボディ、ミトコンドリア、ミクロゾームの分画は、藤原らの方法¹⁰⁾を用いて分画し、ほぼ等しい条件でインキュベートする目的で、蛋白量を約0.7mg/mlに調整して、実験に供した。

3. インキュベート法

容量約15mlのワールブルグフラスコの main chamber に試料液2~3 mlを入れ、side armに Hg^0 0.1ml, center well に必要に応じて、3%過酸化水素 (H_2O_2) 0.1ml を加え、37°Cでインキュベートした。

阻害剤による阻害実験は、終濃度20mMのK-CN または NaN_3 を加え、対照試験液とともに37°C 1時間のプレインキュベーションを行なった。

なお酵素を用いた実験においては、水銀イオンによる酵素活性の阻害を防ぐ目的で、終濃度3mMのEDTAを必要に応じて試料液に添加した。

4. 測定法

蛋白量の測定：ラット肝の分画の場合は、アミドブラックメンブラン法¹¹⁾、その他の場合は、Biuret法により測定した。

カタラーゼ活性の測定：過ホウ素酸法¹²⁾によ

り測定した。

全水銀の測定：試料液0.1~1mlに6%過マンガン酸カリウム溶液5ml及び10N硫酸10mlを加え、加熱灰化を行なった後、還元気化原子吸光法¹³⁾により測定した。

結 果

1. ラット肝の遊離細胞及びホモジネートによる金属水銀の取り込みとメチルアルコール及びエチルアルコールの作用

細胞構造の違いによる Hg^0 の取り込みを比較検討する目的で、肝の遊離細胞及びホモジネートに対する Hg^0 の取り込みを検討した (Table 1)。過酸化水素が存在しない条件において、遊離細胞は、ホモジネートとほぼ同程度の Hg^0 の取り込みを示した。一方過酸化水素が存在する条件においては、ホモジネートの Hg^0 の取り込みは増加したが、遊離細胞においては、その増加は認められなかった。

メチルアルコール (MeOH) 及びエチルアルコール (EtOH) の Hg^0 の取り込みに対する作用を検討し、その成績も同じく Table 1 に示した。メチルアルコール又はエチルアルコールの添加により、遊離細胞及びホモジネートにおいては、過酸化水素の有無にかかわらず、著明な Hg^0 の取り込みの減少が認められた。すなわち、メチルアルコールの添加により、遊離細胞においては72~93%の抑制が、ホモジネートにおいては、78~82%の抑制が認められた。エチルアルコールを添加した場合には、遊離細胞において60~84%の抑制が、ホモジネートにおいて65~75%の抑制が認められた。

アルコールによる Hg^0 の取り込みの抑制がカタラーゼの活性の阻害による抑制であるか否かを検討する目的で、ホモジネートにメチルアルコール及びエチルアルコールを添加し、インキュベーションを行ない、カタラーゼ活性の変動を過ホウ素酸法により測定した (Table 2)。その結果、アルコールの添加は、カタラーゼ活性に対して、ほとんど影響を与えていないことが明らかになった。なお Hg^0 を添加することにより、カタラーゼ活性が若干低下する傾向が認められた。

Table 1 *In Vitro* Metallic Mercury Uptake by Rat liver Dissociated Cells and Homogenate.*

	Protein		Added		Mercury Uptake ($m \pm \sigma_{n-1}$)		Catalase Activity
	mg/ml	H ₂ O ₂ (3%)	Alcohol(0.3%)	μ g/ml	ng/mg.protein		PU/mg.protein
Sucrose Buffer	-	+	-	0.004 \pm 0.001	-	-	-
TPB Buffer**	-	+	-	0.016 \pm 0.001	-	-	-
Dissociated Cells in TPB Buffer**	3.77	-	-	2.480 \pm 0.200	657 \pm 51.7	1.0	1.21
		-	MeOH	0.166 \pm 0.044	44 \pm 11.7	0.07	-
		-	EtOH	0.402 \pm 0.011	106 \pm 2.9	0.16	-
		+	-	2.420 \pm 0.160	642 \pm 42.4	1.0	1.21
		+	MeOH	0.666 \pm 0.060	177 \pm 15.9	0.28	-
Homogenate in Sucrose Buffer	3.75	+	EtOH	0.963 \pm 0.004	255 \pm 1.1	0.40	-
		-	-	2.510 \pm 0.163	669 \pm 43.5	1.0	1.95
		-	MeOH	0.445 \pm 0.008	119 \pm 2.1	0.18	-
		-	EtOH	0.622 \pm 0.005	166 \pm 1.3	0.25	-
		+	-	3.050 \pm 0.050	814 \pm 146	1.0	1.95
+	MeOH	0.664 \pm 0.234	177 \pm 62.4	0.22	-		
+	EtOH	1.080 \pm 0.100	288 \pm 26.7	0.35	-		

*Solution was exposed to metallic mercury vapor at 37°C for 3 hours.

**Tetra phenyl boron buffer.

Table 2 Effect of Methyl Alcohol(MeOH) and Ethyl Alcohol(EtOH) on the Catalase Activity and the Metallic Mercury Uptake.

	Alcohol	H ₂ O ₂	Hg ⁰	Catalase Activity	Mercury Uptake
	0.3%	3%	0.1ml	PU/mg.protein***	ng/mg.protein***
Homogenate*	-	-	-	0.911 \pm 0.170	-
	-	+	+	0.827 \pm 0.080	239 \pm 25.0
	-	+	-	0.945 \pm 0.134	-
	-	+	+	0.635 \pm 0.049	247 \pm 25.3
	MeOH	-	-	1.060 \pm 0.185	-
	MeOH	+	-	1.070 \pm 0.167	-
	EtOH	-	-	1.044 \pm 0.039	-
	EtOH	+	-	1.098 \pm 0.051	-
Catalase**	-	+	-	330 \pm 6.0	-
	-	+	+	251 \pm 16.1	21,800 \pm 4,200
	MeOH	+	-	390 \pm 42.4	-
	MeOH	+	+	315 \pm 42.4	5,040 \pm 1,350
	EtOH	+	-	371 \pm 5.5	-
	EtOH	+	+	300 \pm 34.3	11,500 \pm 4,400

*Protein concentration in the incubation mixture was 11.0mg/ml and initial catalase activity was 0.815 \pm 0.032PU/mg.protein. Mixture was incubated for 3 hours at 37°C.

**Protein concentration in the incubation mixture was 0.017 mg/ml and initial catalase activity was 405 \pm 0.20 PU/mg.protein. Mixture was incubated for 1.5 hours at 37°C

***mean \pm σ_{n-1}

肝の結晶カタラーゼについても、 Hg^0 の取り込みに対するアルコールの作用とカタラーゼ活性の変動について検討した (Table 2). 結晶カタラーゼによる Hg^0 の取り込みは、メチルアルコール及びエチルアルコールの添加により抑制された。しかし、ホモジネートと同様に、過ホウ酸法により測定したカタラーゼの活性は、アルコールの添加により抑制されなかった。なお、肝の結晶カタラーゼにおいても、 Hg^0 の添加により、カタラーゼ活性が低下する傾向が認められた。

2. ラット肝の細胞内顆粒による金属水銀の取り込み

細胞内に存在する顆粒による Hg^0 の取り込みを検討する目的で、ラットの肝臓よりマイクロボディー、ミトコンドリア及びミクロゾームの分画を調整し、 Hg^0 の取り込みとカタラーゼ活性阻害剤の影響を検討した (Table 3). カタラーゼの比活性は、マイクロボディーが最も大きく、つづいてミクロゾーム、ミトコンドリアの順に減少した。過酸化水素の存在下における Hg^0 の取り込みは、マイクロボディーが最も大きな取り込みを示し、つづいてミクロゾーム、ミトコンドリアの順に減少し、カタラーゼの比活性と取り込みの間にある程度比例した関係が認められた。カタラーゼ活性阻害剤であるシアン化カリウム (KCN) 及びアジ化ナトリウム (NaN_3) の作用も同じく Table 3 に示した。KCN の添加により約45%の抑制が、 NaN_3 の添加により約90%の抑制が各分画において認められた。

3. 3価の鉄イオン及び3価の鉄を含有するヘムタンパク質による金属水銀の酸化

生体内に存在すると考えられる鉄化合物による Hg^0 の取り込みを検討する目的で、チトクロームC、メトヘモグロビン、ヘマチン、塩化第2鉄及び硝酸第2鉄を用いて、 Hg^0 の取り込みをカタラーゼと比較検討した (Table 4). 過酸化水素の存在下においては、カタラーゼ、チトクロームC、メトヘモグロビン及び3価の鉄イオンが Hg^0 の取り込みを示したが、ヘマチンは取り込みを示さなかった。過酸化水素が存在しない条件においては、メトヘモグロビン及び3価の鉄イオンが Hg^0 の取り込みを示したが、カ

タラーゼ、チトクロームC及びヘマチンはいずれも取り込みを示さなかった。本実験においては、反応液に取り込まれた水銀イオンによる酵素活性の阻害を防ぐ目的で、3 mM の EDTA を添加しているが、3 価の鉄イオンによる取り込みは、等モルの EDTA の添加により、ほぼ完全に抑制された。なお硝酸第2鉄は塩化第2鉄と同程度の取り込みを示し、共存する陰イオンの影響は認められなかった。

これらの鉄化合物による取り込み能力を比較検討する目的で、化合物に含れる鉄当りの取り込み能力を比較し、その成績を同じく Table 4 に示した。過酸化水素の存在下における鉄当りの取り込み能力は、塩化第2鉄に対して、カタラーゼは約27,000倍、チトクロームCは約140倍、メトヘモグロビンは約35倍の取り込み能力を示し、カタラーゼの Hg^0 取り込み能力が著るしく大きいことが明らかになった。

考 察

動物実験において、正常マウスに比較してカタラーゼ活性が著るしく低いアカラセミアマウス¹⁴⁾、また3-アミノ-1, 2, 4-トリアゾール (AT) 投与のマウス¹⁵⁾において、肺及び血液における Hg^0 の取り込みの減少が報告されており、動物の Hg^0 の吸収に対してカタラーゼが大きな役割をはたしていることが明らかになっている。しかし、この場合においても、肝臓においては水銀量の増加が報告¹⁴⁻¹⁵⁾されており、肝臓における Hg^0 の取り込み機構については、現在においても不明の点が多い。

肝臓の遊離細胞とホモジネートとの間に Hg^0 の取り込みの差異は認められなかった (Table 1). Hg^0 は脂質可溶性であることが報告^{5,16)}されているが、このために Hg^0 は容易に細胞膜を通過できる可能性が考えられる。過酸化水素添加の影響はホモジネートに強く作用したが、過酸化水素の生体膜透過性は、細胞膜の構造により異なることが考えられる。しかし、肝のホモジネートにおける過酸化水素の添加の影響は、赤血球の場合^{6,17)}よりも小さい。肝細胞内においては、ウリカーゼ、D-アミノ酸酸化酵素などの過酸化水素生成酵素がマイクロボディーに局

Table 3 *In Vitro* Metallic Mercury Uptake by Rat Liver Cell Components.*

Fraction	Protein	Catalase Activity		Inhibitor	Mercury Uptake($m \pm \sigma_{n-1}$)		
	mg/dl	PU/ml	PU/mg protein	20mM	$\mu\text{g/ml}$	ng/mg.protein	Ratio
Mitochondria	0.79	3.54	4.45	—	1.98 ± 0.26	$2,480 \pm 319$	1.0
				KCN	1.06 ± 0.11	$1,330 \pm 137$	0.54
				NaN_3	0.22 ± 0.02	275 ± 25.1	0.11
Microbody	0.64	6.56	10.2	—	2.76 ± 0.68	$4,290 \pm 1,060$	1.0
				KCN	1.76 ± 0.14	$2,440 \pm 175$	0.57
				NaN_3	0.14 ± 0.02	175 ± 25.1	0.05
Microsome	0.89	4.88	5.49	—	2.57 ± 0.26	$2,890 \pm 292$	1.0
				NaN_3	0.23 ± 0.04	293 ± 43.9	0.10

*3% hydrogen peroxide was added to center well of Warburg flask and incubated at 37°C for 3 hours.

Table 4 *In vitro* Metallic Mercury Uptake by Catalase, Cytochrom C, Methemoglobin, Hematin and Ferric Ion.*

Solution	Added		Mercury Uptake (mean $\pm \sigma_{n-1}$)		
	$\text{H}_2\text{O}_2(3\%)$	EDTA(3mM)	$\mu\text{g/ml}$	$\mu\text{g}/\mu\text{moles.Fe.hr}$	Ratio/(Fe)
Phosphate Buffer	—	+	0.025 ± 0.020	—	—
M/15, pH6.8	+	—	0.032 ± 0.010	—	—
Catalase	+	+	0.035 ± 0.010	—	—
50 $\mu\text{g}/3\text{ml}$	—	+	0.040 ± 0.010	—	—
Cytochrom C	+	+	1.539 ± 0.134	3.47×10^3	2.69×10^4
200 $\mu\text{g}/3\text{ml}$	—	+	0.034 ± 0.003	—	—
Methemoglobin	+	+	0.178 ± 0.025	1.83×10^1	1.42×10^2
6mg/3ml	—	+	0.099 ± 0.009	3.92×10^{-1}	3.03×10^0
Hematin	+	+	0.862 ± 0.064	4.47×10^0	3.46×10^1
Na_2CO_3 Buffer	—	—	0.043 ± 0.008	—	—
M/15, pH10.2	+	—	0.053 ± 0.009	—	—
Hematin	—	—	0.052 ± 0.012	—	—
6mg/3ml	+	—	0.052 ± 0.013	—	—
HCl	—	—	0.035 ± 0.005	—	—
9mM	+	—	0.074 ± 0.006	—	—
FeCl_3	—	—	0.211 ± 0.039	3.90×10^{-2}	3.02×10^{-1}
3mM	+	—	0.654 ± 0.209	1.29×10^{-1}	1.00×10^0
	+	+	0.102 ± 0.023	—	4.65×10^{-2}
$\text{HNO}_3(9\text{mM})$	+	—	0.054 ± 0.010	—	—
$\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$	+	—	0.587 ± 0.070	1.18×10^{-1}	9.15×10^{-1}
3mM	+	+	0.058 ± 0.011	—	6.90×10^{-3}

*Solution was exposed to mercury vapor at 37°C for 1.5 hours

にしていることが報告¹⁸⁾されている。このため肝細胞内における過酸化水素の濃度は、 Hg^0 の酸化に十分な濃度に達している可能性が考えられる。

肝の細胞内顆粒における Hg^0 の取り込みは、過酸化水素の存在下において、カタラーゼの活

性とある程度比例していることが明らかになった。マイクロボディーはペルオキシゾーム(Peroxisome)¹⁸⁻¹⁹⁾とも呼ばれ、前述した如く、カタラーゼとD-アミノ酸化酵素、ウリカーゼなどの過酸化水素生成酵素が共存している。このためにマイクロボディーの分画においてある程

度強い取り込みが生じたものと考えられる。

肝のホモジネート及び結晶カタラーゼにおいて、メチルアルコール及びエチルアルコールの添加により、 Hg^0 の取り込みが抑制された。しかし過ホウ素酸法によるカタラーゼ活性の測定においては、カタラーゼ活性の減少は認められなかった。カタラーゼは通常の酵素作用 ($2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$) 以外に、ペルオキシダーゼ作用²⁰⁾ ($\text{H}_2\text{O}_2 + \text{AH}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{A}$) を行ない、例えばエチルアルコールはこのペルオキシダーゼ作用により、アセトアルデヒドに酸化される²⁰⁾ことが報告されている。 Hg^0 の酸化をアルコールが抑制するにもかかわらず、カタラーゼ活性の抑制が認められないという事実は、カタラーゼのペルオキシダーゼ作用における基質として Hg^0 が酸化されている可能性が考えられる。さらにエチルアルコールの酸化還元電位²¹⁾ ($E' = -0.20\text{V}$) は Hg^0 の酸化還元電位¹⁶⁾ ($E' = 0.37\text{V}$) よりも低いために、エチルアルコールが Hg^0 よりも優先的に酸化される結果、 Hg^0 の取り込みが抑制されるものと考えられる。

Hursh⁸⁾らは、エチルアルコールを投与したマウスを水銀蒸気に暴露した場合の Hg^0 の生体内分布を検討し、エチルアルコール投与群の肝臓に多くの Hg^0 が分布したと報告している。もし肝臓が生体における Hg^0 の酸化の場合ならば、エチルアルコールの投与により、肝においても Hg^0 の酸化が抑制されるはずであるが、Hurshらの結果は異なっている。これは、エチルアルコールの投与により、肺及び血液などにおける Hg^0 の酸化が抑制されるために、 Hg^0 として肝臓に達する割合が増加すること、そして肝臓においては、エチルアルコールが代謝されるために、アルコール濃度が減少し、肝臓において Hg^0 が酸化される割合が増加する可能性が考えられる。

生体内には、カタラーゼ以外に Hg^0 を酸化する物質が存在している可能性がある。カタラーゼと同様にヘムを有する酸化酵素に、チトクロームC、ペルオキシダーゼなどがあり、ペルオキシダーゼは Hg^0 を酸化することが報告²²⁻²³⁾されている。またヘモグロビンは弱いながらもオキシダーゼ作用やカタラーゼ作用を有し²⁴⁾、さらにメトヘモグロビンもペルオキシダーゼ作

用を有する²⁴⁾ことが報告されている。このような酸化還元酵素やペルオキシダーゼ作用を有する化合物について Hg^0 の酸化の可能性を検討した。今回の実験により、3価の鉄を有するチトクロームC及びメトヘモグロビンが弱いながらも Hg^0 を酸化することが明らかになった。しかしこれらの化合物の基本骨格であるヘマチンは、 Hg^0 の酸化能力を示さなかった。このことは、ヘマチンの酸化還元電位²⁴⁾ ($E' = -0.13\text{V}$) がチトクロームC²¹⁾ ($E' = 0.254\text{V}$)、メトヘモグロビン²⁴⁾ ($E' = 0.14\text{V}$) に比較して非常に低く Hg^0 の酸化還元電位¹⁶⁾ ($E' = 0.37\text{V}$) と非常に掛け離れていることが関係している可能性がある。

3価の鉄も Hg^0 を酸化する能力を示したが、EDTAを添加することにより、酸化能力は消失した。カタラーゼなどのポルフィン化合物が Hg^0 を酸化する能力を持つものに対して、EDTA- Fe^{3+} キレートが酸化能力を持たないことは、キレートを生成している鉄原子の電子構造が Hg^0 の酸化に関与している可能性が考えられる。3価の鉄イオンが持つ過酸化水素分解作用は、配位するポルフィンによって増強されると言われているが²⁴⁾、 Hg^0 の酸化においても同様な現象が存在する可能性がある。

結 論

ラット肝の遊離細胞、ホモジネート及び細胞内顆粒(マイクロボディ一分画、ミトコンドリア一分画、ミクロゾーム分画)について金属水銀の取り込みを試験管内実験において検討した。さらに3価の鉄イオン、チトクロームC、メトヘモグロビン、カタラーゼ及びヘマチンについて金属水銀の取り込みを比較検討するとともに、カタラーゼによる金属水銀の取り込みに対するエチルアルコール及びメチルアルコールの作用を検討し、次の結果を得た。

1) ラット肝の遊離細胞はホモジネートと同程度の取り込み能力を示した。

2) 過酸化水素の添加により、ホモジネートの金属水銀の取り込みは、1.22倍に増加したが、遊離細胞においては、取り込みの増加は認められなかった。

3) ホモジネート、遊離細胞及び肝の結晶カ

タラーゼの金属水銀の取り込みは、エチルアルコール及びメチルアルコールの添加により抑制されたが、カタラーゼの活性の抑制は認められなかった。

4) ラット肝の細胞内顆粒における金属水銀の取り込みは、マイクロボディー分画が最も大きく、つづいてミクロゾーム分画、ミトコンドリア分画の順に減少した。カタラーゼの比活性は、マイクロボディー分画が最も大きく、つづいてミクロゾーム分画、ミトコンドリア分画の順に減少し、金属水銀の取り込み量とカタラーゼ活性の間にある程度の比例関係が認められた。またカタラーゼ活性阻害剤であるシアン化カリウム及びアジ化ナトリウムの添加により金属水銀の取り込みの抑制が何れの分画においても認められた。

5) チトクロームC、メトヘモグロビン、カタラーゼ及び3価の鉄イオンは、過酸化水素の存在下において、金属水銀の取り込みを示した。過酸化水素の存在しない条件においても、メト

ヘモグロビン及び3価の鉄イオンは金属水銀の取り込みを示したが、カタラーゼ及びチトクロームCは取り込みを示さなかった。

6) ヘマチンは、過酸化水素の有無にかかわらずなく、金属水銀の取り込みを示さなかった。

7) 3価の鉄イオンによる金属水銀の取り込みは、等モルのEDTAの添加により、ほぼ完全に抑制された。

8) 過酸化水素の存在下における鉄当りの金属水銀取り込み能力は、塩化第2鉄を基準として、カタラーゼは約27,000倍、チトクロームCは約140倍、メトヘモグロビンは約35倍の取り込み能力を示し、カタラーゼの金属水銀取り込み能力が著しく大きいことが明らかになった。

謝 辞

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

文 献

1. 後藤稔, 池田正之, 原一郎編: 産業中毒便覧. 医歯薬出版, pp.224—225, 1972.
2. 喜田村正次, 近藤雅臣, 瀧澤行雄, 藤井正美, 藤木素士: 水銀. 講談社, pp.125—133, 1977.
3. Kudsk, F.N.: The influence of ethyl alcohol on the absorption of mercury vapour from the lungs in man. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 23, 263—274, 1968.
4. Kudsk, F.N.: Factors influencing the *in vitro* uptake of mercury vapour in blood. *Acta Pharmacol. Toxicol.* 27, 161—172, 1969.
5. 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. 335—375, 1972.
6. 劍持堅志: 金属水銀のカタラーゼによる取り込みに関する研究 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る取り込み. 岡山医学会雑誌, 92, 999—1005, 1980.
7. Magos, L., Clarkson, T.W. and Greenwood, M.R.: The depression of pulmonary retention of mercury vapor by ethanol: Identification of the site of action. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 26, 180—183, 1973.
8. Hursh, J.B., Greenwood, M.R., Clarkson, T.W., Allen, J. and Demuth, S.: The effect of ethanol on the fate of mercury vapor inhaled by man. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 214, 520—527, 1980.
9. Rappaport, C.: Effect of temperature on dissociation of adult mouse liver with sodium tetraphenylboron (TPB). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 121, 1022—1025, 1966.
10. 藤原史子: ラット及びマウス肝細胞内軽糸粒体画分諸酵素の顆粒外遊出に及ぼす諸種分画溶液の影響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.

11. Nakao, T., Nakao, M. and Nagai, F.: Microdetermination of protein not affected by the various buffers, sucrose, ATP and Eluates from polysaccharide derivatives. *Aual. Biochem.* **55**, 358—367, 1973.
12. Feinstein, R.N.: Perborate as substrate in a new assay of catalase. *J. Biol. Chem.* **180**, 1197—1202, 1949.
13. Jacobs, M.B., Yamaguchi, S. and Gilbert, H.: Determination of mercury in blood. *Am. Ind. Hyg. A Assoc. J.* **21**, 475—480, 1975.
14. Ogata, M., Ikeda, M.: Mercury uptake by acatalasemia mice and their erythrocytes, lung and liver homogenate. *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth.* **41**, 87—93, 1979.
15. 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.
16. 椎川誠：自然環境中における水銀の分布と挙動。化学と工業, **28**, 565—570, 1975.
17. Ogata, M., Sugata, Y. and Ikeda, M.: *In vitro* mercury uptake by human acatalasemic erythrocytes. *Arch. Environ. Health* **34**, 218—221, 1979.
18. De Duve, C., Pressman, B.C., Gianetto, R., Wattiaux, R. and Appelmans, F.: Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue. *Biochem. J.* **60**, 604—617, 1955.
19. 川本進, 田中握夫, 福井三郎：酵母ペルオキシゾーム（マイクロボディ）：構造, 機能およびその応用, 生化学, **51**, 1009—1022, 1979.
20. Keillin, D. and Hartree, E.F.: Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. *Biochem.* **39**, 293—301, 1945.
21. H. Gutfreund: エンザイム, 化学同人, pp. 46—50, 1975.
22. 池田己喜子, 熊城一男, 井上豊治, 緒方正名, 石田立夫：金属水銀の生体内酸化に及ぼす還元型グルタチオンの影響。岡山県環境保健センター年報, **1**, 104—108, 1977.
23. Magos, L., Halbach, S. and Clarkson, T. W.: Role of catalase in the oxidation of mercury vapor. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 1373—1377, 1978.
24. 上代皓三, 中尾喜久：血色素の生理と臨床。医学書院, pp. 1—214, 1958.

Metallic mercury uptake by catalase

In Vitro metallic mercury uptake by rat liver dissociated cells, homogenate, cell components, heme protein and ferric ion, with the effect of ethyl and methyl alcohol on the uptake

Katashi KENMOTSU

Department of Public Health, Okayama University Medical School

(Director: Prof. M. Ogata)

In Vitro metallic mercury uptake by rat liver dissociated cells, homogenate, cell components (microbody-rich fraction, mitochondrial fraction and microsomal fraction), heme protein (catalase, cytochrome c, methemoglobin and hematine) and ferric ion were investigated. The effects of ethyl and methyl alcohol on the uptake were also investigated.

The following results were obtained.

- 1) Mercury uptake by rat liver dissociated cell was similar to the uptake by homogenate.
- 2) Mercury uptake by rat liver homogenate in the presence of hydrogen peroxide was 1.22 times the uptake in the absence of hydrogen peroxide. The uptake by rat liver dissociated cells in the presence of hydrogen peroxide was similar to the uptake in the absence of hydrogen peroxide.
- 3) Mercury uptake by crystalline catalase, rat liver dissociated cells and homogenate was inhibited by ethyl alcohol and methyl alcohol, though inhibition of catalase activities was not observed.
- 4) Mercury uptake by rat liver cell components was observed in the order of microbody-rich fraction > microsomal fraction > mitochondrial fraction, and catalase activities were also observed in the order of microbody-rich fraction > microsomal fraction > mitochondrial fraction. Mercury uptake by rat liver cell components was inhibited by potassium cyanide and azide.
- 5) Cytochrome c, methemoglobin, catalase and ferric ion oxidized metallic mercury in the presence of hydrogen peroxide. In the absence of hydrogen peroxide, methemoglobin and ferric ion oxidized, but catalase and cytochrome c did not oxidize metallic mercury.
- 6) Hematine did not oxidize metallic mercury with or without hydrogen peroxide.
- 7) Uptake by ferric ion was inhibited by equimolar addition of EDTA.
- 8) In the presence of hydrogen peroxide, mercury uptake by catalase was 27,000 times, cytochrome c was 140 times and methemoglobin was 35 times the uptake by ferric ion. Therefore, of heme protein catalase showed the highest mercury uptake.