L-アスコルビン酸，DL-α-トコフェロール，スーパーオキサイドアニオン及びマウス肝上清分画による水銀イオンの還元

（水銀の酸化及び還元に関する試験管内及び動物実験　第1編）

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

倉　橋　康二郎

（平成元年3月27日受稿）

Key words：reduction of mercuric ion, L-ascorbic acid, DL-α-tocopherol, superoxide anion, liver homogenate

緒　言

金属水銀は水銀の採掘現場での水銀の抽出作業やアマルガム製造，電池製造，苛性ソーダ製造等の過程に用いられ[1)2)]，作業者はその蒸気（Hg^0）として暴露される．

無機水銀の代謝に関する研究は，数多く成されてきた．

無機水銀イオン（Hg^{++}）をラットの静脈内投与した実験，及び金属水銀蒸気（Hg^0）に暴露した実験では，水銀はふん，尿から排泄され，臓器中では，腎臓に集積される[3)4)5)]．

無機水銀は，呼気中からもわずかではあるが，排出される[6)]．

金属水銀暴露の際に，金属水銀（Hg^0）は細胞中のカタラーゼ，ペルオキシダーゼのペルオキシダーゼ作用により酸化され[7)8)]，アミノトリアゾールは，カタラーゼがH_2O_2と結合してコンパウンドIを形成するのを阻害して，水銀の酸化を抑制する[9)]．

低級アルコールが存在するとカタラーゼのペルオキシダーゼ作用によりH_2O_2が低級アルコール及び金属水銀（Hg^0）の両者から電子を競合して奪うため，金属水銀を暴露した際には[10)]金属水銀の酸化が抑制され，呼気中に多くの金属水銀が排出され，体中の水銀の取り込みは抑制される[11)12)13)]．

そして血液，組織中のカタラーゼ活性が低いアカタラセミアマウスは水銀蒸気に暴露した際に，肝臓では有意に高いが，ほぼ全ての臓器中水銀量，及び体中の総水銀量がノーマルマウスより有意に少なく，又呼気中には多く排出される[14)15)16)17)18)]．

又剣持ら[18)]は試験管内還元実験で，水銀イオンの還元が，キサンチン-キサンチンオキシダーゼ系から生ずるスーパーオキサイドアニオンにより量反応論的に増加することを示し，細胞中の水銀イオンの還元はミトコンドリア中の呼吸鎖のチトクローム系と連鎖した，スーパーオキサイドアニオンによる可能性を報告している．

Clarksonら[19)]は，無機水銀イオン（Hg^{++}）の肝，腎ホモジネイトによる試験管内還元実験を行い，マウスの肝臓，腎臓ホモジネイトの105,000 g，1～2時間後の超遠沈後に得られる上清分画に，沈査分画より高い水銀イオン還元能力があるとしている．この上清分画にはカタラーゼを有していると考えられる．

筆者は，生体内での水銀イオン還元の基礎実験として，生体内に存在し還元作用が強いL-アスコルビン酸（ビタミンC），抗酸化作用として知

られる$_{DL}$-α-トコフェロール（ビタミンE），及びスーパーオキサイドアニオンを用いて水銀イオンの試験管内還元実験を行い添加モル濃度と水銀イオン還元率との関係を求め，各々の還元力について比較検討した．

又，マウス肝ホモジネイトの超遠沈後の上清分画について，細胞質内ペルオキシソーム中のカタラーゼが上清分画へ余り遊離しない条件と遊離する条件の試料を作成し，先の3物質と同様な還元実験を行い比較検討したので報告する．

材料と方法

1．実験材料

1）実験試薬

放射性標識塩化第二水銀（$^{203}HgCl_2$，1μCi＝0.839μg及び1.236μg Amersham），$_L$-ascorbic acid（和光純薬KK，東京，特級），$_{DL}$-α-tocopherol（和光純薬，一級），methanol（99.6%，和光純薬，特級），potassium superoxide（半井化学，特級），dicyclohexyl 18-crown-6（半井化学，特級），dimethyl sulfoxide（和光純薬，特級），polyvinylpyrrolidone K-30（PVP，半井化学，MW＝abt，40,000），Hopcalite I（半井化学，MnO_2 50%，CuO 30%，Co_2O_3 15%，Ag_2O 5%），Hopcalite II（半井化学，MnO_2 60%，CuO 40%），$_L$-cystein 塩酸塩（和光純薬，特級），消ほうシリコーン（TOSHIBA，TSA 737）

2）実験器具

試験管ミキサー，テフロンホモジナイザー（OMEGA ELEC. TYPE SM-3），超遠沈機（HITACHI 66P），インキュベーター，小型バブラー（5 mℓ用，作業環境測定用，柴田科学，メッシュ孔100～150μm），ミゼットインピンジャー（柴田科学，D-2型），空気ポンプ（IWAKI CO. AP-032Z），気体流量計，ピンチコック，プラスチック試験管（栄研チュウブ1号），ウェルシンチレーションカウンター（ALOKA CO. JDC-701）

3）実験動物（肝ホモジネイト作成）

dd系♀マウス（13週齢）

2．試料の調製方法

還元試料と$^{203}HgCl_2$試薬の調製方法，並びにバブリング条件を（表1）に示す．

1）還元試料の調製方法

(1) $_L$-アスコルビン酸（ビタミンC）；$_L$-アスコルビン酸を3 mℓの燐酸緩衝液（44mM, pH6.8）に溶かし$^{203}HgCl_2$試薬1 mℓを添加後の濃度は，0～10μMの間の濃度になる様にした．

(2) $_{DL}$-α-トコフェロール（ビタミンE）；$_{DL}$-α-トコフェロールを3 mℓのメタノールに溶かし$^{203}HgCl_2$試薬1 mℓを添加後の濃度は，0～2.0 mMの間の濃度になる様にした．

(3) スーパーオキサイドアニオン（O_2^-）；超酸化カリ（KO_2）を3 mℓのdimethyl sulfoxide（DMSO）に懸濁してモル比1：2でdicyclohexyl18-crown 6と共に溶かし[20]，$^{203}HgCl_2$試薬1 mℓを添加後の濃度は，0～200mMの間の濃度になる様にした．

(4) マウス肝ホモジネイト；マウスの肝臓を摘出し，8.5% saccharose 11% polyvinylpyrrolidone（pH4.0）（PVP溶液）にて20%（w/v）のホモジネイトをテフロンホモジナイザーを用いて作成し，78,600 g，30分超遠沈後の上清分画[21]には，ペルオキシソームからカタラーゼが余り遊離しない上清分画[22]が得られる．その上清液と，燐酸緩衝液（44mM，pH6.8）（PB溶液）にてカタラーゼが上清に遊離する条件にて同様に作成した上清液を採集した．

2）$^{203}HgCl_2$水溶液の調製方法

(1) $_L$-アスコルビン酸，$_{DL}$-α-トコフェロール及びスーパーオキサイドアニオンによる還元に用いた$^{203}HgCl_2$試薬；1 μCiの放射性標識塩化第二水銀（$^{203}HgCl_2$，0.839μg）を総量1 mℓで燐酸緩衝液（44mM，pH6.8）に溶かした．

これは，最終4 mℓで，1.033μMの水銀イオン溶液となる．

(2) 肝ホモジネイトによる環元に用いた$^{203}HgCl_2$試薬；1 μCi（1.236μg）に$_L$-システイン塩酸塩をモル比1：200で加えた後，1 mℓ蒸留水を加えた．この調製法は，システインのSH基にHg^{++}を結合させ，-S-Hg-S-を作成し安定化させるものである．

即ち（図1）のごとく，システインの2.193mg/mℓと$^{203}HgCl_2$の10μCi/mℓ（12.36μg/mℓ in 0.5 N HCl）を作成して等量加え，後で0.5NのNaOHで中和してから総量を蒸留水で10mℓにし

	L-Cystein 塩酸塩	$^{203}Hg^{++}$
molec wt.	175.64	203
10μCi		12.36μg
モル比200：1	2.139mg/mℓ	12.36μg/mℓ in 0.5N HCl

1 mℓ　1 mℓ

↓ +0.5N NaOH 1 mℓ +DW

1 μCi/mℓ(6.1μM), 10mℓ

図1　システイン水銀複合体10mℓの作成方法

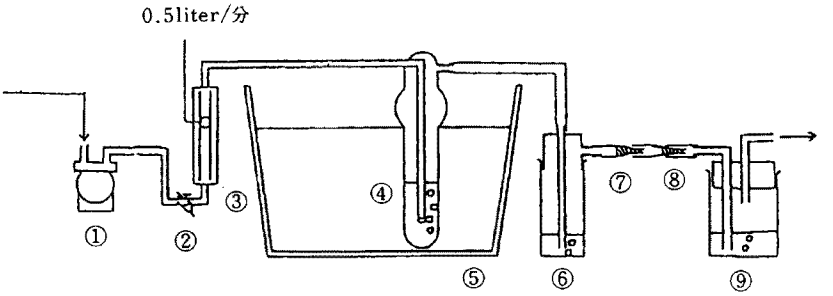
た．各実験には，1.0mℓずつ用いた．

3．還元実験

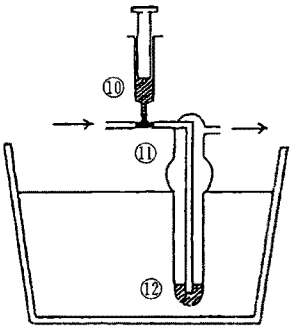
水銀イオン還元装置を（図2）に示す．

1）37℃に調整したインキュベーターに入れてある，小型バブラーに，放射性塩化第二水銀（$^{203}HgCl_2$）溶液1mℓと，調整した還元試料3mℓを入れて，活性炭を通した室内空気（約22℃）を空気ポンプで小型バブラー内に送入して，0.5 liter/分/バブラーの流速で5分間，バブリングを行い，還元反応を促進すると共に，還元で生じた Hg^0 ガスの反応液からの放出を促した．

スーパーオキサイドアニオンについては，（図2-B）にあるように，三方活栓につながった小型注射器内に $^{203}HgCl_2$ 試薬を入れておき，バブリングの直後にバブラー内の O_2^- 溶液に注入した．



A 通常の水銀イオン還元装置



B スーパーオキサイドアニオンにおける付加装置

図2　水銀イオン還元装置
①空気ポンプ　②ピンチコック　③気体流量計　④反応混合溶液を入れている小型バブラー　⑤インキュベーター　⑥0.5%システイン水溶液　⑦⑧ホップカライトフィルター　⑨6％ $KMnO_4$ 硫酸酸性溶液　⑩ $^{203}HgCl_2$ 水溶液が入っている小型注射器　⑪　三方活栓　⑫O_2^- 溶液　→空気の流れを示す．

これはスーパーオキサイドアニオンが水と反応して，分解するのを防ぐためである．

肝ホモジネイトについては，（表1）に示す様に，バブリング時間は30分間で，インキュベーターの調整温度は37℃と0℃である．

2）バブラーから生じた Hg^0は，0.5%システイン溶液を通して，ミスト状態の Hg^{++}を捕獲後，ホップカライトI（MnO_2 50%，CuO 30%，Co_2O_3 15%，Ag_2O 5%），ホップカライトII（MnO_2 60%，CuO 40%）をガラス管6㎜内径に40㎜にわたり詰め，両端を脱脂綿で塞いだフィルターに，この順に通して，Hg^0を酸化吸着した．その後6%$KMnO_4$酸性溶液を通してから室内へ放出した．

4．還元された Hg^0の測定方法，並びに還元率の算出方法

ホップカライトI，ホップカライトIIフィルターに酸化吸着された $^{203}Hg^0$ 及びバブラー内残留 $^{203}Hg^{++}$，システイン溶液中 $^{203}Hg^{++}$ は，各々をディスポーザブル試験管に入れて，ウェルシンチレーションカウンターにて放射能（cpm）を測定し，下記の式（左辺は何れも測定し算出した放射能を示す）にて還元率を算出した．

（ホップカライトI＋ホップカライトII）/（ホップカライトI＋ホップカライトII＋システイン溶液＋バブラー）×100＝水銀イオン還元率

（注；分母の放射能は添加放射能のそれとほぼ等しかった．）

各々同じモル濃度について還元率を3回測定し，平均値及び標準偏差（SD）を求めた．

5．マウス肝ホモジネイト超遠沈上清分画のカタラーゼ活性の測定

1）試料を20℃にて perborate 法にてカタラーゼ活性を測定した．

2）試料を lowry 法にて蛋白濃度を測定した．

3）1）及び2）からカタラーゼ比活性度（PU/g）を算出した．

結　　果

1．3種の還元物質による添加モル濃度と水銀イオンの還元

3種還元物質の添加モル濃度と水銀イオン還元率を（表2）及び（図3）に示す．又，3物質の還元力の比較を（表3）に示す．

1）$_L$-アスコルビン酸（ビタミンC）による還元

添加モル濃度と還元率の間には，（図3，A）に示される様に，シグモイドの関係が得られた．50%還元のモル濃度は2.48±0.13μMが得られた．

2）$_{DL}$-α-トコフェロール（ビタミンE）による還元

添加モル濃度と還元率の間には（図3，B）に

表1　試料の調整方法

試料名	試料の作成	$^{203}HgCl_2$試薬	反応条件 (分)	反応条件 (℃)
ビタミンC ($_L$-ascorbic acid)	0-10μMの範囲で燐酸緩衝液（44mM，pH6.8）に溶かす	1μCi/バブラー	5	37
ビタミンE ($_{DL}$-α-tocopherol)	0-2 mMの範囲で99.6%のメタノールに溶かす	燐酸緩衝液中（44mM, pH6.8）に溶かす	5	37
スーパーオキサイドアニオン（O_2^-）	0-200mMの範囲でDMSOにmol比1：2でdicyclohexyl 18-crown-6とともに溶かす		5	37
マウス肝ホモPBの超遠沈上清分画	44mM P.B.（pH6.8）で20%の肝ホモジネイトを78,600 g 30 min後の上清分画	1μCi/バブラー Mol比200：1で $_L$-システインと結合させたもの	30	37
マウス肝ホモPVPの超遠沈上清分画	8.5%Sac. in 11%PVP(pH4.0)で20%の肝ホモジネイトを78,600 g 30min後の上清分画		30	37 0

示される様に，L-アスコルビン酸と同様にシグモイドの関係が得られた．50%還元の濃度は0.71±0.05mM であった．

3）スーパーオキサイドアニオンによる還元

スーパーオキサイドアニオン溶液に放射性塩化第二水銀水溶液を注入すると，バブリング以外にガスが発生した．これは，スーパーオキサイドアニオンが，不均化反応[10]を起こして，以下の反応式にて，酸素ガスと過酸化水素（H_2O_2）が生じたものと考えられた．

$$2\ O_2^- + 2\ H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

添加モル濃度と還元率の間には（図3，C）に示される様に，直線関係が得られた．50%還元の濃度は外挿で274.6±28.6mM であった．

表2-A　L-アスコルビン酸による添加モル濃度と水銀イオン還元率

L-AsA (μM)	reductive rate (%) of mercuric ion (m±SD)
0	0.57±0.07
0.49	2.83±0.87
0.97	5.02±0.47
2.70	56.78±4.26
6.84	96.31±0.39
9.68	96.21±0.88

表2-B　DL-α-トコフェロールによる添加モル濃度と水銀イオン還元率

DL-α-toco. (mM)	reductive rate (%) of mercuric ion (m±SD)
0	1.07±0.01
0.18	3.33±1.17
0.36	9.57±0.35
0.79	56.85±6.68
1.25	74.21±2.36
1.83	79.80±2.86

表2-C　スーパーオキサイドアイオンによる添加モル濃度と水銀イオン還元率

O_2^- (mM)	reductive rate (%) of mercuric ion (m±SD)
0	0.73±0.02
2.5	3.13±0.40
30	7.48±0.74
100	19.74±1.23
200	37.43±3.42

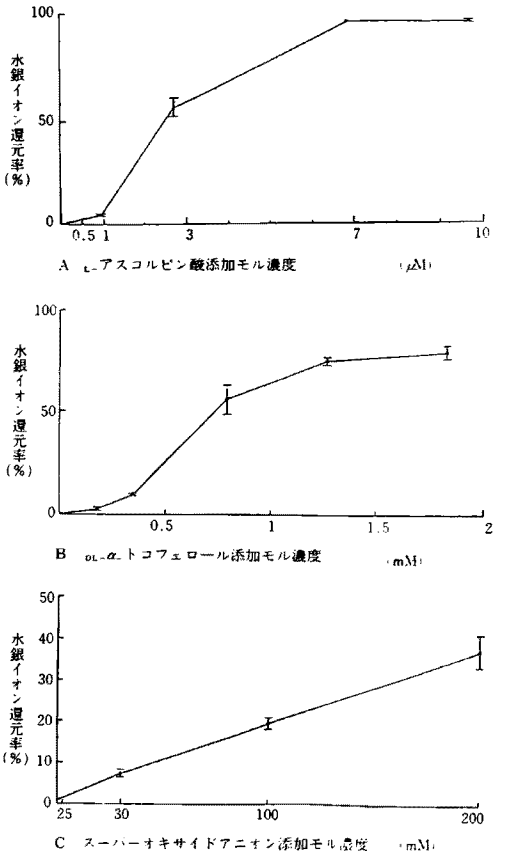


図3　3種の還元物質の添加モル濃度と水銀イオン還元率

表3　3種還元物質による水銀イオン還元の比較

materials	L-AsA	DL-toco.	O_2^-
50%還元時のモル濃度	2.48μM ±0.13	0.709mM ±0.050	274.6mM ±28.6
50%還元のモル濃度の比較	1	285	110,726
逆数の比較	1 :	1/300 :	1/110,000

又，各々の平均値は，Welch の方法で $p<0.05$ で有意であった．

2．マウス肝ホモジネイト超遠沈上清分画のカタラーゼ比活性度と塩化第二水銀の還元率

PVP 溶液及び PB 溶液を用いて作成した，肝ホモジネイト超遠沈上清分画のカタラーゼ比活性度と，水銀イオン還元率を（表4）及び（図4）に示す．

1）マウス肝ホモジネイトの超遠沈上清分画のカタラーゼ比活性度

44mM (pH6.8) 燐酸緩衝液にて作成した上清分画は，1,213±121PU/g であり，8.5% sac. 11% PVP (pH4.0) にて作成した上清分画は，97.7±31.7PU/g であった．前者は後者のほぼ12倍であり，$p<0.01$ (n＝3，3) で有意であった．

2）マウス肝ホモジネイト上清分画による塩化第二水銀の還元

(1) ペルオキシソームからカタラーゼを上清分画に遊離させない方法，即ち8.5% saccharose，11% polyvinylpyrrolidone (pH4.0) を用いて78,600 g，30分間の超遠沈後の上清分画による還元率は0.127±0.038%であり，カタラーゼを遊離させる条件，即ち44mM 燐酸緩衝液 (pH6.8) を用いた上清分画による還元率は，0.020±0.003%で前者は後者より6.4倍高い還元率を得，Welch の方法で，$p<0.05$ で有意であった．

(2) 8.5% sac. 11% PVP の上清分画の 0℃ での還元率は0.020±0.004%であり，37℃の 0.127±0.038%とは Welch の方法で，$p<0.05$ で有意であった．

表4 肝ホモジネイト超遠沈上清分画のカタラーゼ比活性度と水銀イオン還元率

試 料	catalese 比活性度 (PU/g) (m±SD)	℃	reductive rate (%) of mercuric ion (m±SD)
肝 sup. with P.B.	1,213±121	37	0.020±0.003
肝 sup. with PVP	97.7±31.7	37	0.127±0.038
		0	0.020±0.004

考 察

3種の還元物質について；

L-アスコルビン酸（ビタミン C）は壊血病の予防と治療になると古くから認められており，強い還元作用をもっている．酸化されると2個の水素を放出（電子を2個放出）し，L-デヒドロアスコルビン酸になる．その中間体としてラジカルをもつモノヒドロアスコルビン酸が報告されている[23]．

今回の実験では，2.48μM の濃度で，約1 μM の Hg^{++} の50%還元が行われ，3物質の中では最も還元力が強かった．

又L-アスコルビン酸の添加モル濃度と水銀イオンの還元率の間にシグモイドの関係が得られたことは，L-アスコルビン酸が関与する反応は，ある濃度に達すると急速にその反応が強くなり，あとは急速に飽和することが考えられる．

DL-α-トコフェロールは脂溶性物質であり，最初は抗不妊因子としての作用[24]が中心であったが，その後抗酸化物質としての作用が注目されてきた[25]．L-アスコルビン酸と同様に生体内に発生するラジカルのスカベンジャーとしての作用や脂肪の酸化を防ぐ作用が，報告されている[26][27]．

DL-α-トコフェロールの構造は，飽和イソプレノイド側鎖とクロマン環からなっており[28]，構造的には1 mol の分子から2 mol の電子の放出が可能で，生体系で同定された代謝産物としては

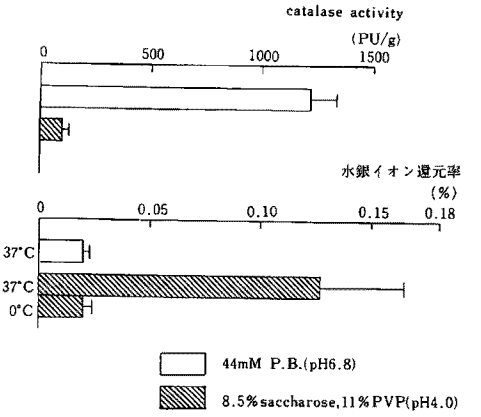


図4 肝ホモジネイト超遠沈上清分画のカタラーゼ比活性度と水銀イオン還元率 m+SD

トコフェロールキノン体が広く知られている[29]. 一方ESRでの研究では1モルの分子から必ずしも2モルの電子が放出されるとは限らないとしている[30].

今回の実験条件では,先の$_L$-アスコルビン酸が水溶液中であるのに対し,75%メタノール溶液という違いがあり,$_L$-アスコルビン酸による還元と同じ条件下の直接の比較は困難であるが,(表3)に示すように,0.709mMの濃度で,約1 μMのHg^{++}の50%還元が行われ,50%還元のモル数の逆数で示す還元力は$_L$-アスコルビン酸の約1/300であった.

スーパーオキサイドアニオン(O_2^-)はpotassium superoxide (KO_2) としてGay Lussac (1811年) により初めて合成された物質であり[31],酵素系ではキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系や他の様々な酸化還元の酸素系から,H_2O_2とともに生じ得るとされている[10].細胞中で生じたスーパーオキサイドアニオン (O_2^-) は,スーパーオキサイドディスムターゼ (SOD) の不均化反応で,既述の式のごとく過酸化水素(H_2O_2)と酸素(O_2)になり[32],過酸化水素は細胞中のペルオキシソーム中に豊富に存在するカタラーゼで水 (H_2O) と酸素 (O_2) に分解処理される[10].

スーパーオキサイドアニオンは,過酸化水素と同様に反応の相手の被酸化性,被環元性により,酸化剤としても働き,又還元剤としても働くという報告がある[33].

緒方,剣持らはキサンチン-キサンチンオキシダーゼ系からスーパーオキサイドアニオンを生成させて水銀イオンを還元させ,両者間に直線関係の存在することを報告した[18].

今回の筆者の実験も又,還元率と濃度の間には同様な直線関係を観察した.

又,今回純粋なスーパーオキサイドアニオンを用いて,スーパーオキサイドアニオンによって水銀イオンを還元することを確認した.

O_2^-はH_2Oに接触するとすみやかに分解してO_2ガスを生じうるので,バブリング直前までH_2Oとの接触による分解を防ぐ工夫をしたが,3物質の中では最も低い還元力であり,約1μMの水銀イオンを50%還元するモル濃度は,外装で274.6mMであった.

生体内で働く$_L$-アスコルビン酸,$_{DL}$-α-トコフェロール,スーパーオキサイドアニオンの還元力は,$_L$-アスコルビン酸>$_{DL}$-α-トコフェロール>スーパーオキサイドアニオンの順であった.

肝細胞の超遠沈上清分画による水銀イオンの還元について;

細胞中のペルオキシソームからのカタラーゼの遊離の少ない上清分画 (8.5% sac. 11% PVP条件下)のカタラーゼ比活性度は,97.7PU/gで,遊離させる条件は,1,213PU/gで,前者は後者より12.4倍低かった.一方,水銀イオン還元率は前者は後者より6.4倍高かった.

これは,還元反応で生じた金属水銀にたいする肝カタラーゼのペルオキシダーゼ作用による金属水銀の再酸化 ($Hg^0 \rightarrow Hg^{++}$) 作用の相違によると考えられた.

又,0℃にて殆ど還元が認められなかったことは,この還元反応に関する酵素反応の関与が推定された.

結　　論

In vitroで3種類の還元物質即ち,$_L$-アスコルビン酸,$_{DL}$-α-トコフェロール,スーパーオキサイドアニオンに放射性標識塩化第二水銀 ($^{203}HgCl_2$)を加えて,37℃のインキュベーターにセットした小型バブラーで5分間バブリングして還元され生じた金属水銀を測定する方法で,還元率を算出した.

又,マウス肝臓ホモジネイト超遠沈上清分画についても同様の還元実験を行った.

得られた結果は,以下に示すとおりである.

1) 3種の還元物質の添加モル濃度と還元率の間には$_L$-アスコルビン酸と$_{DL}$-α-トコフェロールではシグモイド曲線を示す関係が得られ,スーパーオキサイドアニオンでは直線関係が得られた.

2) 水銀イオンを50%還元する3物質の各々の添加モル濃度は$_L$-アスコルビン酸で2.48μM,$_{DL}$-α-トコフェロールでは0.71mM,スーパーオキサイドアニオンでは274.6mM (外挿) であり,還元力は$_L$-AsA>$_{DL}$-α-toco.>O_2^-の順を示した.

3) マウス肝ホモジネイト超遠沈上清分画によ

る塩化第二水銀の還元は，ペルオキシソームからカタラーゼを余り遊離させない上清分画（即ち8.5% saccharose, 11% polyvinylpyrrolidone, pH4.0を用いてホモジネイトを作成）のカタラーゼ活性は，カタラーゼを遊離させる上清分画のそれより12.4倍低かった．又，前者による還元率は後者より6.4倍高かった．この結果は，上清分画で還元され生じた金属水銀に対する，肝カタラーゼのペルオキシダーゼ作用による金属水銀の再酸化作用の相違によると推定された．

4）37℃と0℃での還元は0.127%と0.020%で上記の還元反応は酵素反応と推定された．

稿を終えるにあたり，絶えず御指導，御校閲いただいた岡山大学医学部公衆衛生学教室緒方正名教授に深謝いたします．

なお本論の要旨は第58回日本衛生学会総会にて発表した．

文 献

1）喜多村正次，近藤雅臣，瀧澤行雄，藤井正美，藤木素士共著：水銀，講談社サイエンティフィック，東京（1976）pp. 261—375.

2）日本化学会編：水銀，丸善株式会社，東京（1977）pp. 99—100.

3）Rothstein A and Hayes AD : The metabolism of mercury in the rat studied by isotope techniques. J Pharmacol Exp Ther (1960) **130**, 166—176.

4）Hayes AD and Rothstein A : The metabolism of inhaled mercury vapor in the rat studied by isotope techniques. J Pharmacol Exp Ther (1962) **138**, 1—10.

5）只友淳雄：$Hg^{203}(NO_3)_2$を用いた水銀中毒に関する実験的研究．第3編，BAL投与時の蛋白結合水銀の変動並びに水銀の排泄状況に関する研究．岡山医誌（1962）**74**, 713—727.

6）Clarkson T and Rothstein A : The excretion of volatile mercury by rats injected with mercuric salts. Health Phys (1964) **10**, 1115—1121.

7）Nielsen-kudsk F : Uptake of mercury vapor in blood in vivo and in vitro from Hg-containing air. Acta Pharmacol Toxicol (1969) **27**, 149—160.

8）Nielsen-kudsk F : Factors influencing the in vitro uptake of mercury vapor in blood. Acta Pharmacol Toxicol (1969) **27**, 161—172.

9）Magos L, Sugata Y and Clarkson TW : Effects of 3-amino-1, 2, 4-triazole on mercury uptake by in vitro human blood samples and by whole rats. Toxicol Appl Phamacol (1974) **28**, 367—373.

10）スミス，ヒル，レーマン，レフコビッツ，ハンドラー，ホワイト：生化学[Ⅰ]，廣川書店，東京（1986）pp. 273—274.

11）Magos L, Clarkson TW and Greenwood MR : The depression of pulmonary retention of mercury vapor by ethanol : identification of the site of action. Toxicol Appl Pharmacol (1973) **26**, 180—183.

12）Dunn D, Clarkson TW and Magos L : Ethanol-increased exhalation of mercury in mice. Br J Ind Med (1978) **35**, 241—244.

13）倉橋康二郎：水銀蒸気暴露後の生体内分布とエタノールの影響．岡山医誌（1989）**101**, 629—646.

14）Ogata M and Ikeda M : Mercury uptake by acatalasemia mice and their erythrocytes, lung and liver homogenates. Int Arch Occup Environ Health (1978) **41**, 87—93.

15）Sugata Y, Halbach S, Allen J and Clarkson TW : Tissue distribution of inhaled mercury vapor in acatalasemic mice. Environ Sci Health (1979) **13**, 97—106.

16）Eide I and Syversen TLM : Uptake of elemental mercury and activity of catalase in rat, hamster, guinea-pig, normal and acatalasemic mice. Acta Pharmacol et Toxicol (1982) **51**, 371—376.

17) Ogata M, Kenmotu K, Hirota N, Meguro T and Aicoh H : Mercury uptake in vivo by normal and acatalasemic mice exposed to metallic mercury vapor ($^{203}Hg^0$) and injected with metallic mercury or mercuric chloride ($^{203}HgCl_2$) Arch Environ Health (1985) **40**, 151—154.

18) Ogata M, Kenmotu K, Hirota N, Meguro M and Aicoh H : Reduction of mercuric ion and exhalation of mercury in acatalasemic mice and normal mice. Arch Environ Health (1987) **42**, 26—30.

19) Dunn JD, Clarkson TW and Magos L : Ethanol reveals novel mercury detoxification step in tissues. Science (1981) **213**, 1123—1125.

20) Valentine JS and Curtis AB : A convenient preparation of solutions of superoxide anion and the reaction of superoxide anion with a copper (II) complex. J Am Chem Soc (1975) **97**, 224—226.

21) 中沢　透：ラット肝のミトコンドリア；細胞分画法，佐藤　了編，岩波書店，東京 (1972) pp. 149—154.

22) Greenfield RE and Price VE : Liver catalase. J Biol Chem (1956) **220**, 607—618.

23) 荒川信彦：アスコルビン酸とその関連化合物の化学；ビタミン学[II]，日本ビタミン学会編，東京化学同人，東京 (1980) pp. 569—578.

24) Evans HM and Bishop KS : On the exsistence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. Science (1922) **56**, 650—651.

25) Olcott HS and Emerson OH : Antioxidants and the autoxidation of fats. Ⅸ. The antioxidant properties of the tocopherol. J Am Chem Soc (1937) **59**, 1008—1009.

26) Dam H : Influence of antioxidants and redox substances on signs of vitamin E defficiency. Pharmacol Rev (1957) **9**, 1—16.

27) Tappel AL : Vitamin E as the biological lipid antioxidant. Vitam Horm (1962) **20**, 493—510.

28) Lucy JA : Functional and structural aspects of biological membranes : A suggested structural role for vitamin E in the control of membrane permeability and stability. Ann N Y Acad Sci (1972) **203**, 4—11.

29) 中村哲也：ビタミンEの吸収と代謝；ビタミン学[I]，日本ビタミン学会編，東京化学同人，東京 (1980) pp. 199—208.

30) Svanholm U, Bechgaard K and Parker VD : Electrochemistry in media of intermediate acidity. Ⅷ. Reversible oxidation products of the α-tocopherol model compounds, cation radical, cation, and dication. J Am Chem Soc (1974) **96**, 2409.

31) 中野　稔，松浦輝男，二木鋭雄：O_2の歴史；スーパーオキシドO_2^-，松浦輝雄編，医歯薬出版，東京 (1986) pp. 7—10.

32) McCord JM and Fridovich I : Superoxide dismutase. J Biol Chem (1969) **244**, 6049—6055.

33) 菅野龍也，櫻木宏親，吉田政幸：スーパーオキシドの化学．有機合化協会誌 (1979) **37**, 335—345.

Study of the reduction of mercuric ion by L-ascorbic acid, DL-α-tocopherol, superoxide anion and the supernatant of mouse liver homogenate. — Experiment of the oxidation or reduction of mercury in vitro and in vivo— part 1

Kouzirou KURAHASHI
Department of Public Health,
Okayama University Medical School,
Okayama 700, Japan
(Director : Prof. M. Ogata)

The reduction of $^{203}Hg^{++}$ by L-ascorbic acid, DL-α-tocopherol, superoxide anion and the supernatant of mouse liver homogenate after the ultracentrifugation were performed.

The results obtained were as follows.

1. The relationships between the reductive rate of mercuric ion and the concentration of the L-AsA or DL-α-tocopherol were shown as a sigmoidal curve; that of the superoxide anion was a linear.
2. The activity of reduction of Hg^{++} was in decreasing order with L-AsA, DL-α-tocopherol, and superoxide anion, respectively.
3. The liver homogenate was used with 8.5% sucrose and 11% polyvinylpirrolidone (PVP) solution with preparation of the homogenate to prevent release of catalase from the peroxisomes. Another preparation used 44mM phosphate buffer(pH 6.8)solution and the liver catalase was released from peroxisomes. The reductive rate of mercuric ion with the former preparation was 6.4 times higher than with the latter. It indicates that the reoxidation of metallic mercury by the catalase reduced the reductive rate of mercuric ion.
4. A reductive experiment of mercuric ion by liver supernatant containing sucrose and PVP at 0°C and 37°C was performed. The reduction rate by this sample at 0°C is 1/5.48 of that at 37°C. This suggests that the reduction of mercuric ion in liver homogenate is due to an enzymatic reaction.