

〔原著〕 松本歯学 7:194~198, 1981

塩化第二水銀のラット肝薬物代謝酵素に対する作用

倉橋 寿

松本歯科大学 歯科薬理学教室(主任 前橋 浩 教授)

The Effect of Mercuric Chloride on Drug-Metabolizing Enzymes in Rat Liver

HISASHI KURAHASHI

Department of Dental Pharmacology, Matsumoto Dental College
(Chief: Prof. H. Maehashi)

Summary

The effect of mercuric chloride on drug-metabolizing enzymes in rat liver was studied *in vivo* and *in vitro*.

In the *in vitro* study, when mercury was added to the incubation mixtures, all enzymes were inhibited. Fifty per cent inhibitory rate was 52 ppm on aminopyrine demethylase, 72 ppm on aniline hydroxylase, 96 ppm on hexobarbital oxidase respectively.

In the *in vivo* study, when rats were ingested mercuric chloride in their drinking water for a month, the quantity of drinking water was decreased against the increase of mercury concentration. Body weight and liver-body weight ratio were also decreased. The concentration of mercury in rat liver was increased in direct proportion to the each quantity of mercury ingestion. Aminopyrine demethylase, aniline hydroxylase and hexobarbital oxidase were all inhibited as well. The inhibition was stronger *in vivo* under the same mercury concentration.

結 言

薬効評価に際しては薬物代謝酵素の活性を考慮する必要があり、現在までにかなりの数の薬物についてその活性に対する影響が明らかにされてきたが、なお不明な薬物も残っており今後の検討が待たれている。

水銀については特殊な作業環境で発生する職業病としての水銀中毒、また過去に大量に散布あるいは漏出した残留水銀の影響、水銀系薬物の生体内への吸収など多くの問題が残っており、その作用は神経系、消化管などに著しい症状を発生させることから多くの研究がなされてきた。これらの水銀の作用については無機水銀と有機水銀に区別して考える必要があるが、薬物代謝酵素に対する影響は詳しくないため、今回、塩化第二水銀を用

(1981年11月2日受理)

いて水銀のラットに対する影響を aminopyrine demethylase, aniline hydroxylase および hexobarbital oxidase について in vitro および in vivo で比較検討した。

実験材料および方法

動物は Wistar 系雄ラットを使用し, in vivo の実験では1群4匹として対照群には蒸留水を, 実験群には 0.2 mM, 0.4 mM, 0.8 mM および 1.6 mM の塩化第二水銀水溶液を1ヶ月間自由に飲用させた。この期間中, 各群のラットの体重の変化, 塩化第二水銀溶液の飲水量, 体重 1 kg 当りの水銀摂取量および hexobarbital 投与による睡眠時間の測定を行なった。

1ヶ月後ラットを断頭して放血させ, 開腹して門脈から1.15%の KCl を通して肝に含まれる血液を洗浄した後, 肝を取り出し氷冷した1.15% KCl で洗浄し濾紙で水分を除いてから重量を測定した。肝は1.15%の KCl を含んだ 0.02 M Tris-HCl buffer (pH 7.4) とともに Potter 型 teflon homogenizer で homogenate を調製した。homogenate は 1 ml 中に肝 0.5 g (50%) を含むものと, 肝 0.25 g (25%) を含むものの2種類を調製し, それぞれ 9,000 × g, 10分間, 0 °C で遠心分離 (TOMY RS-20 P, No.3N roter) して, その上清部を測定用の薬物代謝酵素標本液とした。

aminopyrine demethylase 活性の測定は, 基質 aminopyrine の脱メチル化により生成された formaldehyde を定量する Nash の方法を一部変更して行った。¹⁾⁶⁾

aniline hydroxylase 活性は基質 aniline の水酸化によって生じた p-aminophenol を定量する Guarino らの方法を一部変更して測定した。²⁾⁶⁾

hexobarbital oxidase 活性は基質 hexobarbital の消失量を定量する Cooper らの方法を一部変更して測定した。³⁾⁶⁾

蛋白質量は Lowry らの方法を一部変更した Bennet らの方法により定量した。⁴⁾⁵⁾⁶⁾

水銀の定量は Dithizone 単色法によって測定した。⁷⁾⁸⁾ すなわちラット肝 9,000 × g 上清 1 ml に濃硫酸 1 ml と 30% 過酸化水素 1 ml を加え弱く煮沸して60分加熱し, ついで 6% 過マンガン酸カリウムを淡紅色が5分間消失しなくなるまで加える。冷却後 20% 塩酸ヒドロキシルアミン数滴を加えて分

解液を脱色し, 1 N 硫酸酸性とするために全量が 36 ml となるまで水を加え濾過して試料液とした。試料液は全量を 50 ml 共栓付遠沈管に取り 0.5% dithizone-chloroform 液の 6 ml を加えて 3 分間振盪後 5 ml の有機層を 10 ml 遠沈管に取り, これに 10 mM EDTA 10 ml と 28% アムモニア 60 ml および水 30 ml から成る EDTA-アムモニア洗浄液 5 ml を加えて振盪し, 水層を捨てて過剰の dithizone を除き, 有機層を水で洗った後, 490 nm の吸光度を測定し水銀を定量した。検量線は 1 ~ 7 μg/ml の水銀を含む塩化第二水銀溶液を用いて同様に操作して作製した。

実験結果

1. 体重変化

Fig.1 は1群4匹の Wistar 系雄ラットに各々 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 mM の塩化第二水銀液, すなわち無機水銀として 40, 80, 160, 321 ppm の溶液を1ヶ月間自由に飲用させた時の体重の平均値の変化を示した。水銀投与群の体重増加は対照群に比べていずれも抑制され, ことに水銀濃度の増加によりその抑制率は増大した。

2. 水銀摂取量と hexobarbital 睡眠時間

Table 1 は各群の体重 1 kg 当りの1日の塩化第二水銀溶液摂取量, 無機水銀としての摂取量および hexobarbital を 100 mg/kg 腹腔投与した時の睡眠時間について測定したものである。ラットの塩化第二水銀溶液摂取量は濃度に反比例して減少し, 321 ppm 群では対照群の約半分の 52% であった。しかし無機水銀としての摂取量は濃度に正比例して増加した。hexobarbital 投与による睡眠時間は 321 ppm 群で有意に延長された。

Fig. 1. Growth curves of rats in mercuric chloride treatment

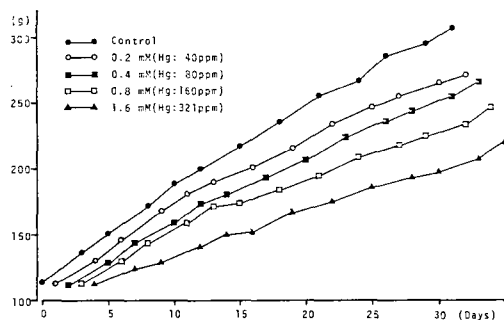


Table 1. Mercury Intake and Hexobarbital Sleep Time

Treatment (as Hg)	Mercury intake		Hexobarbital sleep time
	(ml/kg/day)	(mg/kg/day)	
Control	135 ± 9	-----	17.3 ± 1.6
40 ppm	101 ± 8*	4.0 ± 0.3	16.3 ± 0.8
80 ppm	98 ± 7*	7.8 ± 0.6	17.0 ± 1.9
160 ppm	88 ± 7*	14.1 ± 1.1	18.0 ± 0.7
321 ppm	71 ± 13*	22.7 ± 4.2	24.7 ± 3.4*

Each value represents the mean ± S.D. of four male rats on mercuric chloride treatment (1 month).
*Significantly different from control value (p < 0.05).

Table 2. Liver/Body Weight Ratio, Liver Protein and Mercury Concentration

Treatment (as Hg)	Liver (g/100g body wt)	Liver protein (mg/g liver)	liver mercury (ppm)
Control	3.89 ± 0.22	207 ± 11	0.00 ± 0.00
40 ppm	3.78 ± 0.18	202 ± 7	2.22 ± 0.26*
80 ppm	3.78 ± 0.18	207 ± 6	3.30 ± 0.54*
160 ppm	3.54 ± 0.11*	212 ± 9	4.86 ± 0.58*
321 ppm	3.35 ± 0.19*	220 ± 5	7.22 ± 1.12*

Each value represents the mean ± S.D. of four male rats on mercuric chloride treatment (1 month).
*Significantly different from control value (p < 0.05).

Table 3. Drug-Metabolizing Enzyme Activities after Prolonged Mercuric Chloride Treatment (1 Month)

Treatment (as Hg)	Hexobarbital oxidase	Aminopyrine demethylase	Aniline hydroxylase
Control	142 ± 16	24.1 ± 1.7	17.3 ± 1.6
40 ppm	114 ± 13	21.2 ± 2.2	15.3 ± 1.0
80 ppm	112 ± 8*	20.8 ± 1.2*	15.1 ± 1.3
160 ppm	109 ± 14*	19.7 ± 1.9*	13.8 ± 1.2*
321 ppm	88 ± 15*	18.3 ± 3.3*	12.5 ± 1.3*

Enzyme activities are expressed as µg of hexobarbital consumed/g liver/10 min (hexobarbital oxidase); µg of formaldehyde formed/g liver/10 min (aminopyrine demethylase); and µg of p-aminophenol formed/g liver/10 min (aniline hydroxylase).
Each value represents the mean ± S.D. of four male rats.
*Significantly different from control (p < 0.05).

3. 肝の変化と水銀量

Table 2 は各群のラットの肝体重比、肝蛋白質量および肝の水銀濃度について示した。肝体重比は160 ppm 群以上で有意に減少し、肝蛋白質量は逆に160 ppm 群以上でやや増加する傾向が見られたが有意差は認められなかった。肝臓中の水銀量については対照群で全く検出されなかったのに対し、投与群ではその濃度増加に伴って水銀量も増加した。Fig. 2 はラット体重1 kg 当りの1日の水銀摂取量と肝臓中の水銀濃度の関連を示したが、投与群の肝水銀量はそれぞれの水銀摂取量に比例して増加する傾向が見られた。

4. 肝薬物代謝に対する水銀の影響

Table 3 は各群のラットの hexobarbital oxidase 活性, aminopyrine demethylase 活性および aniline hydroxylase 活性について測定したものであるが hexobarbital oxidase と aminopyrine

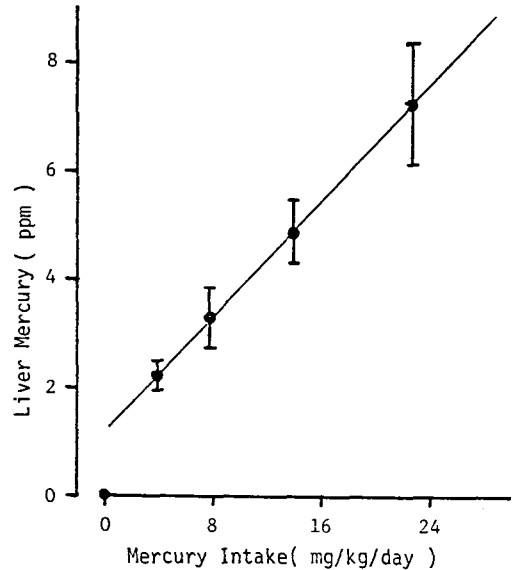


Fig. 2. The correlation between mercury accumulation in rat liver and amount of mercury intake.

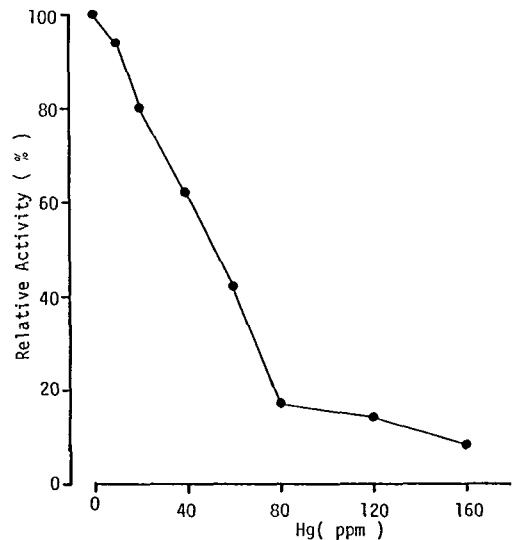


Fig. 3. The effect of mercury on aminopyrine demethylase activity in vitro.

demethylase が 80 ppm 以上で, aniline hydroxylase が 160 ppm 以上で有意な抑制を示した。

5. in vitro での水銀の影響

酵素反応溶液中に塩化第二水銀を加えて水銀濃度を 0 ppm から 160 ppm まで変化させ、それぞれの薬物代謝酵素活性を測定した結果を Fig. 3, Fig. 4, Fig. 5 に示した。薬物代謝酵素活性は水銀

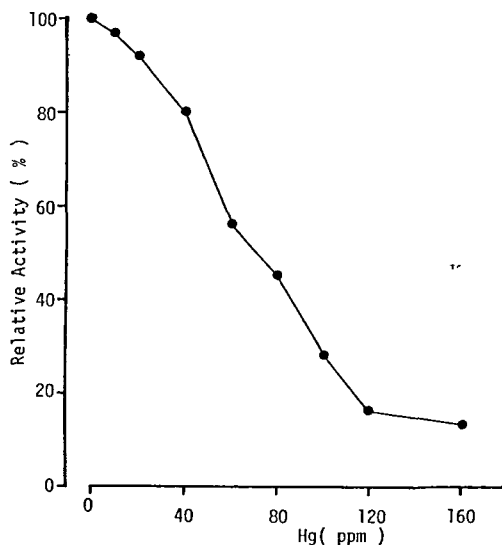


Fig. 4. The effect of mercury on aniline hydroxylase activity in vitro.

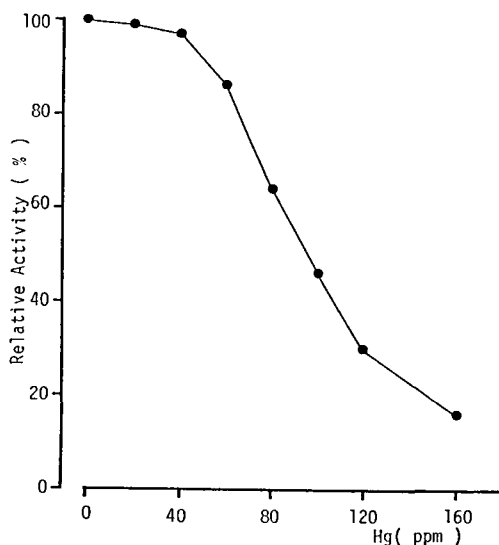


Fig. 5. The effect of mercury on hexobarbital oxidase activity in vitro.

濃度増加により全て急激に低下し、50%活性阻害濃度は aminopyrine demethylase で 52 ppm, aniline hydroxylase で 72 ppm, hexobarbital oxidase で 96 ppm であった。

考 察

無機水銀は気道、経口、経皮のいずれからも体内に侵入するが、なかでも経気道の例が多く、その中毒の大部分は職業病として水銀を扱うために

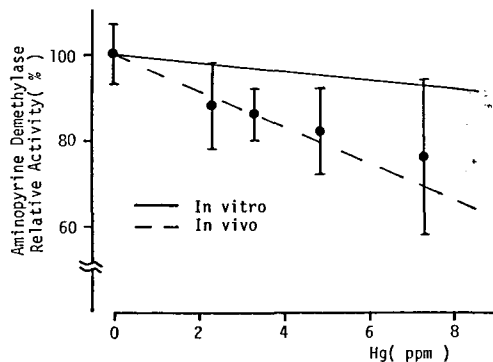


Fig. 6. The comparison with inhibitory effect on mercury for aminopyrine demethylase activity between in vivo and in vitro.

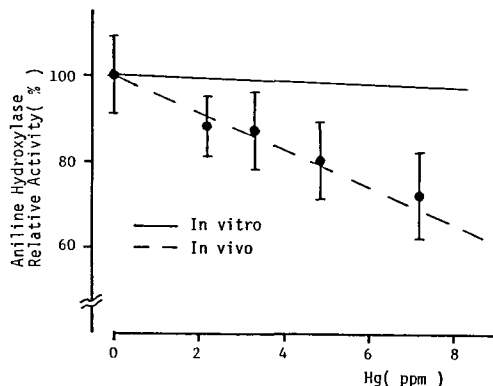


Fig. 7. The comparison with inhibitory effect on mercury for aniline hydroxylase activity between in vivo and in vitro.

生じる。無機水銀の体内蓄積部位は腎臓が最も多く、次いで肝臓であり、その他の臓器には比較的少量が存在する。投与後8日間の無機水銀総排泄量は投与量の約60%であるが、長時間少量ずつの水銀が気道から体内に侵入すると精神神経症状や蛋白尿などの腎障害を生ずることがある。また生体の細胞や酵素に対しても阻害作用があるので肝薬物代謝酵素に対しても影響があるかどうか調べた。

塩化第二水銀を用いた今回の結果、in vivo では hexobarbital oxidase が一番強く抑制され、aniline hydroxylase, aminopyrine demethylase の順であったが、in vitro における50%酵素活性阻害濃度では逆に aminopyrine demethylase が 52 ppm で一番抑制され hexobarbital oxidase は 96 ppm で最も阻害を受けにくかった。しかし Fig. 6, Fig. 7, Fig. 8 に示したように in vivo と in vitro

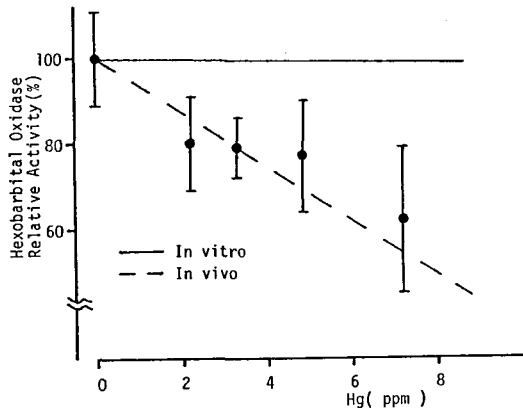


Fig. 8. The comparison with inhibitory effect on mercury for hexobarbital oxidase activity between in vivo and in vitro.

を水銀の同濃度で比較すると、in vivo における阻害が強く生じたのは肝に存在する無機水銀が継続的な肝薬物代謝酵素に作用してその活性を低下させたためと考えられ、in vitro の実験で示されたように、単に反応溶液中に無機水銀が存在するだけなら、その活性は in vivo ほど阻害を受けないことがわかる。しかしこのように薬物代謝酵素活性を阻害することから、水銀が継続的に体内に侵入すれば他の薬物の代謝能力が低下し、結果としてその作用が増強されることも考えられる。

in vivo 実験で、ラットは飲料水中の水銀濃度が増加するにつれてその飲水量を減らしたが、摂取した水銀量の増加に伴い体重および体重100gあたりの肝重量の減少が見られ、ことに肝体重比の減少から水銀には肝の萎縮作用の傾向があるものと認められた。しかし肝臓中の蛋白量は有意差はないものの、やや増加する傾向が見られた。肝臓中水銀濃度は摂取した水銀量に正比例して増加しており、一般に体内に分布した水銀化合物は SH 基に対する親和性が高いことから、肝臓中においても蛋白質構成アミノ酸の SH 基と結合して薬物代謝酵素などの活性を阻害し毒性を発現しているものと考えられる。

ま と め

塩化第二水銀のラット肝薬物代謝酵素に対する影響を in vitro および in vivo で測定した。

in vitro での影響は、incubation 溶液中の水銀濃度の増加にともない全ての酵素活性が抑制され、50%阻害率は aminopyrine demethylase で 52 ppm, aniline hydroxylase で 72 ppm, hexobarbital oxidase では 96 ppm であった。

in vivo では、ラットの水銀の摂取量と肝水銀濃度が正比例して増加しており、それに伴って体重、肝体重比は逆に減少した。薬物代謝酵素活性は全て抑制され hexobarbital oxidase で特に強く生じる傾向が見られた。

同じ水銀の濃度では、in vivo の方が強く薬物代謝酵素活性を抑制しており、肝に存在する水銀が継続的に作用した結果によるものと推察された。

文 献

- 1) Nash, T (1953) The colorimetric estimation of formaldehyde by means of the Hantzsch reaction. *Biochem. J.* 55: 416—421.
- 2) Guarino, A. M., Gram, T. E., Gigon, P. L., Greene, F. E. and Gillette, J. R. (1969) Changes in Michaelis and spectral constants for aniline in hepatic microsomes from phenobarbital treated rats. *Mol. Pharmacol.* 5: 131—136.
- 3) Cooper, J. R. and Brodie, B. B. (1955) Enzymatic metabolism of hexobarbital. *J. Pharmacol. exp. Ther.* 114: 409—417.
- 4) Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. biol. Chem.* 193: 265—275.
- 5) Bennett, T. P. (1967) Membrane filtration for determining protein in the presence of interfering substances. *Nature*, 213: 1131—1132.
- 6) 倉橋 寿 (1977) フッ化ナトリウムのラット肝薬物代謝酵素に及ぼす影響. *松本歯学*, 3: 15—21.
- 7) 日本化学会防災化学委員会(1970)生体試料中水銀分析法. *化学と工業*, 23: 603—607.
- 8) 日本化学会防災化学委員会(1970)ジチゾン法による水銀の比色分析法. *化学と工業*, 23: 474—477.