原 著

実験的フッ素中毒ラットにおける造血系 酵素の変動について

——ALA-D および ALA-S の活性変動——

丹 羽 源 男* 近 藤 雅 雄** 中 村 義 昭*
梶 本 雅 俊** 浦 田 郡 平**

概要：フッ素の大量投与が成長期ラットにおける造血系酵素のうち、末梢血 δ -aminolevulinic acid dehydrase (ALA-D)，ならびに骨髓 δ -aminolevulinic acid synthetase (ALA-S) におよぼす影響について調べた。生後4週齢の雄ドンリュウ系ラットに対してフッ素として1日の摂取量が2, 4, 6, 8, 10mg になるように NaF を含んだ飼料を4週間投与し、1週間毎に尾静脈より少量採血で、ALA-D 活性、網赤血球数、ヘマトクリット値を測定した。4週経過後に屠殺し、骨髓について ALA-S 活性を測定した。結果として末血 ALA-D 活性と骨髓 ALA-S 活性が上昇し、ヘマトクリット値が低下することがわかった。これによって、フッ素大量投与はラット骨髓のヘム生合成機構に何らかの異常を起こさせることが示唆され、これについて考察した。

緒 言

自然界に広く存在するフッ素はかなり以前より、ウ蝕の予防に効果があるといわれ^{1,2)}、歯面塗布、洗口、水道水添加などのように応用範囲も広い。しかし、一方では大気中や飲料水中のフッ化物による人体への為害作用も報告されており³⁾、ウ蝕予防手段として用いるうえで、今後とも生体への影響を十分、調査、研究する必要がある。

著者らは種々環境物質の生体造血機能への影響を調べているが、フッ素についてはヘマトクリット値 (Ht 値)^{4,5,6)}や赤血球形態⁷⁾などへの影響を調べたもののほかは、ヘム合成酵素の活性を直接測定した研究は少ない。著者らは、急性フッ素中毒時の造血系酵素の変動に注目し、ヘム生合成8酵素のうち、最初の律速段階をつかさどる δ -aminolevulinic acid synthetase (ALA-S)、ならびにその次の段階をつかさどる酵素で、多くの環境因子に鋭敏に変動することがわかっている δ -aminolevulinic acid dehydrase (ALA-D) の活性を測定した結果、興

味ある知見を得たので報告する。

実験方法

1. 実験動物とフッ素投与条件

Donryu 系ラットを用い、同腹より生れた5匹を計6腹、30匹として、各群の構成を5匹とし、群内は各匹とも異腹とし、ケージに1匹ずつ個別飼育した。control diet による予備飼育一週間の後、フッ素の一日摂取量として2, 4, 6, 8, 10mg になるように NaF 水溶液を18%カゼイン食 (Table 1) に添加して投与を開始した。一日一匹15g の割りで飼量を与え4週間連続飼育し、ラット生存数を調べた。

2. 血中 ALA-D および骨髓中 ALA-S の活性度測定

飼育開始後、フッ素各投与群について一週毎に体重測定し、同時に尾静脈より少量(約10 μ l)を採血し、Ht 値を測定したほか、残部について、および4週経過後、エーテル麻酔下に腋窩下動静脈を切断、屠殺の際に得られた血液について ALA-D 活性を測定した。測定法は、

* 日本歯科大学歯学部衛生学教室 (主任：辻 達彦教授)

** 国立公衆衛生院栄養生化学部

* *Department of Hygiene, Nihon Dental University, Tokyo (Director: Prof. Tatsuhiko TSUJI)*

** *Department of Nutrition and Biochemistry, Institute of Public Health, Tokyo*

昭和56年5月10日受付

Table 1 Composition of experimental diet (%)

	(%)
Casein	18
Corn starch	67
Soy bean oil	10
Salt mixture ¹⁾	5
Vitamin mixture ²⁾	*

- 1) Composition by Harper, A. E. 1959 J. Nutr., 68: 405.
- 2) Composition: (mg/100g diet) thiamin, 0.5; riboflavin, 0.8; pyridoxine, 0.5; nicotinic acid, 4.0; p-Ca-Pantothenate, 4.0; folic acid, 0.4; cyanocobalamin, 0.003; biotin, 0.04; myoinositol, 10; p-aminobenzoic acid, 10; choline, 200; retinol, 1000; ergocalciferol, 100 IU; α -tocopherol, 4; manauquinone, 0.5

Granick-Mauzerall らの従来法に熱処理 (60°C, 5分) と Zn⁺ 添加とを追加した我々の修正法⁹⁾を用いた。この新法によれば従来法に比べて1.5~2倍の活性度が得られ、より真の ALA-D 値に近いと推定される。ALA-S の測定は、採り出したラット大腿骨から氷冷生理的食塩水を用いて洗い出した骨髓液につき、Aoki らの原法⁹⁾を修正した Kondo らの方法¹⁰⁾で測定した。なお、in vitro での ALA-S, ALA-D 活性におよぼすフッ素の影響を調べるために、まず、ALA-D は、ラット肝より、Anderson らの方法を多少修正し、精製した ALA-D に10, 100, 1000mM の各 NaF 溶液を加え、活性変動を調べた。ALA-S は精製標品を得られないのでフッ素非曝露ラット骨髓について酵素液を調製し、ALA-D と同じフッ素溶液を加え、活性変動を見た。

3. 網赤血球数の測定

末梢血について網赤血球染色用ガラス毛细管キャピロット (テルモ社, VC-RO 75NM ニューメチレンブルー) を使用し、計数した。

4. 血液中、及び骨中フッ素濃度の測定

採取した血液は血球、血漿に分離し、血漿についてフッ素濃度を測定した。骨については大腿骨を60°C, 48時間乾燥し、秤量後、粉碎し、Hexamethyldithioxane で飽和させた HClO₄ に溶解し、60°C, 1時間拡散させ、0.1N NaOH にて捕集し、血漿と同様 TISAB III (全イオン強度補正用緩衝液) を試料の 1/10 量加え、イオンメーター (オリオン社製407A型) にてフッ素濃度を測定した。

実験結果

1. フッ素投与量について

Table 2 Number of rats surviving

F (mg)	0	2	4	6	8	10
rat number	5	5	5	5	1	1

Fig. 1 Effect of F intake on body weight
 —○—○ control; —△—△ 2 mg F;
 —▲—▲ 4 mg F; —●—● 6 mg F;
 Vertical lines represent standard deviation of mean.

本実験では、開始時体重が100g 前後であるから、最大フッ素投与群では、ほぼ60mg/kg となり、十分、フッ素急性中毒を起こし得ると考えられ、4週経過後のフッ素投与別ラット生存数は、Table 2に示すように、8, 10mg フッ素投与群が1匹を残して全て死亡した。よって、これらの群は今回の実験より除外した。

2. 体重変化について

Fig. 1に各週における体重を示した。対照群の体

重増加に比して、フッ素中毒群は増加に乏しく、特に 6 mg フッ素群はほとんど体重増加をみなかった。

3. Ht 値の変化について

実験開始時点と 4 週経過時点における Ht 値を Table 3 に示す。投与フッ素量の増加にしたがい、Ht 値が減少した。

Table 3 Effect of fluoride poisoning on hematocrit (%)

F (mg)	start	4 weeks
0	39.8±2.8	40.2±2.9
2	40.0±1.4	39.9±2.5
4	41.3±2.1	38.5±2.2
6	41.8±3.5	35.4±2.1

Fig. 2 ALA-D activity of peripheral blood during the developing stage. Symbols as in Fig. 1. Vertical lines represent standard deviation of mean.

4. 血中 ALA-D 活性について

実験期間中、各週毎のラット尾血 ALA-D の変動を Fig. 2 に示す。対照群ラットの血中 ALA-D 活性は生後 3～4 週がピークでその後、急激に低下しているが、フッ素中毒群ではフッ素投与量の増加により、その活性減少は対照群と同様に次第に鈍になり、4 週経過までには、対照群にくらべて 6 mg フッ素投与群は有意な活性上昇がみられた ($p < 0.01$)。また、4 mg フッ素投与群では実験 3 週まで 6 mg フッ素投与群同様に上昇傾向がみられたが、実験終了時には対照群との間に有意な差がみられなかった。

5. 骨髄中 ALA-S 活性について

実験 4 週経過後の骨髄中 ALA-S の変動を Fig. 3 に示す。骨髄中 ALA-S 活性は 4, 6 mg フッ素投与ラットで対照群に比して約 1.5 倍の有意な活性上昇 ($p < 0.05$) を表わした。

6. 網赤血球数について

実験開始時点、および 4 週経過時点の網赤血球数を各フッ素投与量別に Table 4 に示した。これにより、各

Fig. 3 ALA-synthetase activity of bone marrow. Vertical lines represent standard deviation of mean.

Table 4 Effect of fluoride poisoning on reticulocytes (%)

F (mg)	start	4 weeks
0	10.5	3.1±0.8
2	11.3	3.4±0.7
4	9.5	3.2±0.8
6	11.4	3.4±0.9

Table 5 F concentration in plasma and femur

F (mg)	(ppm)	
	plasma	Femur
0	0.036±0.01	14.70± 3.50
2	0.200±0.04	1299.20±223.63
4	0.550±0.19	2356.60±340.35
6	1.08 ±0.21	3019.60±248.15

Table 6 In vitro effect of fluoride on ALA-D and ALA-S activity

F conc. (mM)	Percent inhibition	
	ALA-D	ALA-S
10	0-trace	0-trace
100	0-trace	0-trace
1000	0-trace	0-trace

フッ素投与量の増加にもかかわらず、網赤血球数にはほとんど変化がないことがわかった。

7. 血漿、骨中フッ素濃度について

実験4週後に屠殺したラットの血漿、骨中フッ素濃度を Table 5 に示した。いずれも投与フッ素量をよく反映しており、特に骨ではフッ素に対する親和性を示した。なお、血漿、骨中各フッ素濃度の間には強い正の相関関係 ($r=0.922$) が認められた (Fig. 4)。

8. In vitro による ALA-D、ALA-S 活性の変動について

Table 6 に示すように、かなり高濃度の NaF 溶液を加えても、ALA-D、ALA-S 共にほとんど阻害を受けないことがわかった。

考 察

今回のフッ素中毒実験で得られた結果の重点は、末梢血中 ALA-D と骨髄 ALA-S の活性上昇である。血中 ALA-D 活性は元来、成長期にある動物においては、成長にともなって急激に低下するという生理的特徴を有している¹¹⁻¹²⁾。一方、この ALA-D はまた、鉛、フェニールヒドラジンによる中毒や鉄欠乏性貧血などにおいて鋭敏に上昇することが知られている^{8,13)}が、これらのいずれの場合にも血中網赤血球数が ALA-D 活性と併行して増減し、両者の間には相関が存在する。ただし、この相関関係にはある程度の量的幅、または時間的な“ずれ”があり得ることも推定されている。今回の実験では、フッ素投与により ALA-D の生理的低下がおくれ、投与4週目の終りでも、対照値に比べて有意な上昇を示した。しかし、この全実験期間を通じて網赤血球数に全く変化が見られなかったことから、この ALA-D 上昇の現象は、ALA-D そのものへのフッ素イオンの直接的な影響と考えるよりも、骨髄 ALA-S の明らかな上昇で示唆される造血の刺激が最初の attack point であると考えの方が妥当である。そして、ALA-S 活性の上昇が対照値の1.5倍程度と、あまり高くないことから、網赤血球数の変動までは起こさないと推定すれば説明可能

Fig. 4 Regression point of fluorine between blood plasma and femur The line in the graph indicates the regression line.

と思われる。しかしながら、網状赤血球の形動的变化も考慮しなければならないが、この点ではヘモグロビン量の測定が必要と考えられる。今回はヘモグロビン量の測定を行っていないので議論の展開が出来ない。このALA-S上昇の原因については、いまのところ推定の域を出ないが、まず、フッ素イオンは解糖系に対して直接強い阻害作用を持っていることが知られている¹⁴⁾ほか、ATPase, Cholinesterase などの間接的共役酵素に対しても阻害的に働くことがわかっている^{15,16)}、フッ素イオンが骨髓において赤芽球内に入り、解糖系の阻害にはじまる一連の連鎖反応を起こした結果、ヘム合成系のどこかをブロックし、これがALA-Sのinductionを起こすのではないかと考えるものである。

つぎの可能性として、これまでに報告されたALA-S誘導現象のほとんどが、ヘム合成鎖上の8酵素のうち、少なくとも一つの活性低下にはじまり、これがgenetical にALA-Sに対するde-repressionにつながっていることから、フッ素中毒においても、フッ素イオンが特定のヘム合成系酵素を一次的にattackして阻害するのではないかとするものである。しかし、今回の実験では、フッ素イオンはin vitroにおいて、少なくともALA-DとALA-Sを阻害しないことがわかっている。したがって、後者の可能性については、今後、この2酵素以外のヘム合成酵素、とくにlast limiting enzymeであるferrochelataseに対する阻害作用を含めた検討を進める必要がある。ヘマトクリット値の低下については、いくつかの報告があり^{3,17,18)}、中でもKahlらによれば¹⁹⁾、それらの事象はフッ素中毒による浸透圧の変化にもとづく体液の片寄り現象と考えられ、これは骨髓の造血機能の変化とは直接の関係を持たないと思われる。

フッ素大量投与では、血液におけるフッ素の局在が重要であるが、血球中のフッ素含有量については、フッ素の膜内外への輸送系がいまだ不明の部分が多いけれども、比較的容易に赤血球膜を通過するといわれる¹⁹⁾。Belisleら²⁰⁾は人血液についてフッ素分布を調べた結果、血球フッ素は血漿中フッ素のほぼ1.7倍であり、各人のバラツキは少ないと報告していることから血球中フッ素は中毒時かなりの濃度になり得ることが想像出来る。

今回のフッ素投与量はかなり高いが、フッ化ナトリウムの致死量は、経口投与の場合、ほぼ50mg/kgであるとの報告があり²¹⁾、さらにAuskapsら²²⁾は、1日につき1~10mgのフッ素投与で、血液に変化を起こすと述べているが、本実験のフッ素量もこれと比較して十分な中毒量といえる。しかし、生体の摂取量は実験対象動物、年齢、性別により、かなり変動するものであり²³⁾、常に

量的変化を伴うものと思われるので、一概に量的決定は難かしいが、Simonらによれば、成熟ラットの方が幼若ラットよりもフッ素に対して順応性があると述べている²⁴⁾。

ヘム合成系を考えるならば、他のヘム律速酵素を測定することが造血系の機構解明に必要であるし、今回の実験のように、一カ月という短期投与がフッ素に対する体の順応性を論ずるには少し、不十分な面も考えられるが、フッ素大量投与がヘム合成系になんらかの影響を与えている示唆の根拠を提示すると思考する。

結 論

1. フッ素中毒ラットの体重増加は対照群に比べて少なかった。
2. 血中ALA-D活性は中毒群、対照群とも成長に伴い、実験2週まで下降したが、その後、フッ素中毒群が対照群に比して有意な活性上昇を示した。
3. 骨髓中ALA-S活性はフッ素中毒群が対照群に比して有意な上昇を示した。
4. 血漿中、及び骨中フッ素濃度はどちらもフッ素投与量とともに増加し、両者の間に有意な相関関係がみられた。
5. 血中Ht値はフッ素中毒群が対照群に比して有意な減少を示したが、網赤血球数については、差は認められなかった。

本研究を遂行するにあたり、多大の助言ならびに援助をいただいた日本歯科大学衛生学教室故鯉沼茆吾教授に深く感謝し、さらに研究上、御協力いただいた国立公衆衛生院栄養生化学部佐々木敦子研究員にも感謝します。

文 献

- 1) McKay, F. F.: The relation of mottled enamel to dental caries, J.A.D.A., 15: 1429-1434, 1928.
- 2) Dean, H. T.: Distribution of mottled enamel in the United States, Publ. Hlth Rep., 48: 703-712, 1933.
- 3) Committee on Biologic Effects of Atmospheric Pollutants: Fluorides National Academic of Sciences, Washington, 1971.
- 4) 平尾 貢: 実験的フッ素中毒症の血液像(第一報), 四国医学誌, 5: 344-383, 1954.
- 5) Messer, H. H., et al.: Effect of reduced fluoride intake by mice on hematocrit values, Nature New Biol, 240: 218-219, 1972.
- 6) Wegner, M. E., et al.: The interrelation of fluoride and iron in Anemia, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 153: 414-418, 1976.

- 7) 西村英明, 他: ウサギ血液における解糖系, 血中カルシウム量および赤血球形態に対する NaF の影響について, 口腔衛生会誌, 27: 337-345, 1978.
- 8) 近藤雅雄, 他: 鉛中毒における末梢血 ALA-D の上昇, 篠原出版, 東京, p. 179-197, 1980.
- 9) Aoki, Y., et al.: Measurement of δ -Aminolevulinic acid synthetase activity in human erythroblast, J. Clin. Invest., 53: 1326-1334, 1974.
- 10) 浦田郡平, 他: 文部省特定研究「難病」班報告書 (昭和52年度), p. 534, 1978.
- 11) 浦田郡平, 他: 日光医学協力計画低栄養専門部会報告書 (昭和50年度), p. 67, 1975.
- 12) 丸田英夫: 鉛中毒に対する生体の感受性に関する研究 (第一報) ラットおよびヒト末梢赤血球 δ -aminolevulinic acid dehydratase 活性について, 産業医学, 19: 67-74, 1977.
- 13) 梶本雅俊, 他: 成長にともなうラットの末梢赤血球中の δ -アミノレブリン酸脱水酵素の変動, 生化学, 49: 683, 1977.
- 14) Borrevang, P., et al.: Pharmacology of Fluorides (Part II), Springer-Verlag, Berlin, p. 48-93, 1970.
- 15) Feig, S. A., et al.: Energy metabolism in human erythrocytes, J. Clin. Invest., 50: 1731-1737, 1971.
- 16) Eva Joblonska, et al.: Incubation studies on human red cell utilizing glucose or inosine under various conditions, J. Lab. Clin. Med., 86: 605-615, 1975.
- 17) Wegner, M. E., et al.: The interrelation of fluoride and iron in Anemia, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 153: 414-418, 1976.
- 18) Kahl, S., et al.: Effect of fluoride on the red cell (^{51}Cr label), plasma (^{125}I HSA label) and true blood volumes of rats, Bulletin, de L'academie polonaise des sciences, 24: 397-402, 1976.
- 19) Underwood, E. J.: Trace elements in human and animal nutrition. 3rd edition, Academic Press, New York, p. 389-390, 1975.
- 20) Belisle, J. et al.: Method for the determination of the total fluorine content of whole blood, serum/plasma, and other biological samples, Anal. Biochem., 87: 545-555, 1978.
- 21) Hodge, H. C., et al.: Biological effects of inorganic fluorides, In J. H. Simons, Ed. Fluorine Chemistry. Vol. 4. New York: Academic Press, p. 786, 1965.
- 22) Auskaps, A. M., et al.: Hemoglobin concentration, thyroid weight and growth rate in rats during minimum fluoride ingestion, J. Nutr., 55: 611-621, 1955.
- 23) Patterson, C. M., et al.: Differences in fluoride levels in the blood between sheep, Rabbit and rat, Archs. Oral Biol., 22: 419-433, 1977.
- 24) Gad Simon, et al.: Effect of dietary fluoride on food intake and plasma fluoride concentration in the rat, J. Nutr., 96: 152-156, 1968.

Abstract: Effect of Fluoride Poisoning on ALA-Dehydratase and ALA-Synthetase Activity. Motoo NIWA*, Masao KONDO**, Yoshiaki NAKAMURA*, Masatoshi KAJIMOTO** and Gumpei URATA**. The effect of fluoride poisoning on the activity of two of the eight heme synthetic enzymes, i.e., ALA synthetase (ALA-S) and ALA-dehydrase (ALA-D) in growing rats was investigated. Male rats of the Donryu strain aged 4 weeks were divided into two groups, a control group and a high fluoride diet group. The fluoride rats were given a diet with 2, 4, 6, 8 and 10mg F (as NaF) for four weeks, during which period blood samples were drawn in quantities of about 100 μl via the tail vein for determination of ALA-D activity, reticulocyte count, and hematocrit (Ht). At the end of the four-week observation period the animals were sacrificed by exsanguination via the axillary vein and the bone marrow was assayed for ALA-S activity. In the fluoride group, the ALA-D activity in peripheral blood and ALA-S activity in bone marrow increased. There were significant decreases in the Ht of rats fed high fluoride diets. From these experimental findings, fluoride poisoning is considered to occur in direct association with heme metabolism.