ホウ酸塩の代謝について (V) ^{*1}
赤血球内の嫌氣的解糖系ならびにメトヘモグロビン
生成におよぼすホウ酸塩の影響について

金島弘恭, 三沢隆行 (北海道立衛生研究所^{*2})

赤木満洲雄 (北海道大学薬学部^{*3})

Studies on the Metabolism of Borate (V^{*1})
Effects of Borate on Anaerobic Glycolysis and Methemoglobin
Formation in Erythrocytes in vivo and in vitro

Hiroyasu Kaneshima, Takayuki Misawa

(Hokkaido Institute of Public Health^{*2})

and Masuo Akagi

(Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University^{*3})

For the purpose of studying the toxicity of borate on the blood, the effects on erythrocytes of guinea pigs were investigated. From the results obtained, the boron levels in erythrocytes were elevated by addition of borate to blood, and it was found that boron can enter into erythrocyte at the considerable rate according to the amount of borate added.

The enzyme system of anaerobic glycolysis in erythrocyte was found to be markedly inhibited by addition of borate.

It was also found that the levels of methemoglobin in erythrocyte revealed a remarkable tendency to increase after boron was added to erythrocyte.

Similar results were also obtained in vivo experiments.

(Received June 21, 1965)

緒 言

著者らはホウ酸塩の毒性に関連する代謝について検討するため、さきに小動物 (家兎, モルモット, ラット) にホウ酸塩を径口投与した場合のホウ素の尿中排泄と臓器および血中分布¹⁾ならびに肝, 脳ホモジネートの嫌氣的解糖作用に対するホウ酸塩の影響²⁾について報告し, その際ホウ素が血中にも分布することおよびホウ酸塩がグルコースの嫌氣的解糖系を, とくに Glyceraldehydephosphate dehydrogenase* の酵素段階で著しく阻害すること³⁾を述べた。今回ホウ素の血液に対す

る毒性を検討するためホウ素の赤血球内侵入の有無, および比較的特異な糖代謝系路を有する赤血球での嫌氣的解糖系に対するホウ酸塩の影響, さらに赤血球内のメトヘモグロビン生成に対するホウ酸塩の影響について検討を加えた。

実 験 の 部

実験方法

1) 動物および飼養条件

動物は体重 0.5~0.95 kg のモルモットを使用し, その飼養条件およびホウ砂溶液の投与法などはすべて第 1 報¹⁾と同様に行なった。

2) 赤血球の分離精製

心臓穿刺により採血し (血液 1 ml につきシュウ酸カリウム 2 mg を添加), ただちに 4°C で赤血球を遠心分離 (3,000r.p.m.×20min.) し等量の 0.15M 塩化カリウム溶液を加えて洗滌を 2~3 回くりかえして赤血球を精製した。

*1 前報 (IV), M. Akagi, T. Misawa, H. Kaneshima: Chem. Pharm. Bull., 投稿中。

*2 札幌市南 2 条西 15 丁目; Nishi-15-chōme, Minami-2-jo, Sapporo.

*3 札幌市北 12 条西 5 丁目; Nishi-5-chōme, Kita-12-jo, Sapporo.

* D-glyceraldehyde-3-phosphate: NAD oxidoreductase(phosphorylating) 酵素番号; 1.2.1.12.

3) ホウ素の定量

著者らのカルミン酸による微量ホウ素の比色定量法⁴⁾によった。

4) 嫌気性解糖作用の測定

嫌気性解糖の試験は Lepage の方法⁵⁾ によって行ない、その際生成する乳酸を Barker-Summerson の方法⁶⁾ によって定量した。

5) メトヘモグロビンの定量

メトヘモグロビンの定量は Evelyn-Malloy の方法⁷⁾ により Beckman 分光々度計を用いて行なった。

実験結果

I. ホウ酸塩添加ならびに投与後の赤血球内ホウ素レベル

1) ホウ酸塩添加による赤血球内ホウ素レベル

モルモットの新鮮血液 5 ml に 0.02M ホウ酸溶液 0.1 ml を加え、ときどき攪拌しながら 30°C の水浴中に 1 時間保ったのち赤血球内のホウ素濃度を測定した。結果は Table I に示したとおり約 40% 強の割合で赤血球内にホウ素の浸透が認められた。

2) ホウ酸塩投与後の動物の赤血球内ホウ素レベル

モルモットに 60~125mg/kg のホウ素をホウ砂溶液として経口投与し、3 時間後に採血し血中および赤血球内のホウ素濃度を測定した。その結果は Table II に示したとおり投与ホウ素はすでに 3 時間後には赤血球内に浸入しそのホウ素レベルは投与ホウ素量の増加に応じて上昇する傾向が認められた。また血漿中のそれに比較して 24.2~47.5% の比率で分布した。

II. ホウ酸塩添加ならびに投与後の赤血球内メトヘモグロビンレベル

Table I Distribution of Boron in Erythrocyte and Plasma after Addition of Borate to Guinea Pig's Blood

Sample No.	Erythrocyte (%)	Plasma (%)
1	41.5	58.5
2	41.0	59.0
3	40.7	59.3
4	42.6	57.4

0.1ml of 0.02M boric acid (220 μ g/ml as B) was added to 5ml of the blood.

Mixtures were incubated for 1 hour at 30°C.

1) ホウ酸塩添加による赤血球内メトヘモグロビンレベル

新鮮血液 0.2ml に 0.02M および 0.04M ホウ酸溶液 (1/60M リン酸二カリウム液で pH 6.6 に調節) をそれぞれに 0.2ml 加えてホウ素レベルを 108 μ g/ml および 216 μ g/ml とし、30°C でときどき振とうしながら 30 分間保ったのち血中のメトヘモグロビン量を測定し、血液 0.2ml に 1/60M リン酸二カリウム液 (pH 6.6) 0.2ml を加えて同様に操作した対照と比較した。その結果はそれぞれ Table III, IV に示すとおりで対照に比較してホウ素レベルが 108 μ g/ml のときは 1.3~6.3 倍、216 μ g/ml のときは 2.2~5.0 倍のメトヘモグロビン量の生成増加が認められた。

2) ホウ酸塩投与後の動物の赤血球内メトヘモグロビンレベル

モルモットに 61.1~133.3mg/kg のホウ素をホウ砂溶液として経口投与し、3 時間後に採血した血液につい

Table II Boron Levels in Erythrocyte and Blood after Administration of Borate to Guinea Pig

Weight (kg)	Sex	Boron administ (mg/kg)	Boron in erythrocyte		Boron per cent in blood	
			Control (μ g/ml)	Boron administ (μ g/ml)	Plasma (%)	Erythrocyte (%)
0.90	♀	61.1	0.2	7.6	—	—
0.80	♀	62.5	0.7	9.8	75.3	24.7
0.80	♂	62.5	0.2	13.8	—	—
0.80	♂	62.5	0.8	14.6	—	—
0.95	♂	63.2	0.6	13.0	—	—
0.75	♂	66.7	1.4	14.8	—	—
0.70	♂	71.4	0.2	13.0	75.8	24.2
0.70	♂	71.4	0.6	14.8	—	—
0.60	♂	83.3	0.2	14.4	65.6	34.4
0.90	♂	111.1	2.4	63.0	52.5	47.5
0.80	♂	125.0	0.8	57.0	53.4	46.6

Boron levels were determined 3hrs after oral administration of borate in a single dose.

Table III Methemoglobin Levels in Erythrocyte after Addition of Borate to Guinea Pig's Blood (1)

Weight (kg)	Sex	Amount of methemoglobin (g/dl)		Ratio of MeHb* form (B/C)	Amount of Hb** (g/dl)
		Control (C)	Boron added (B)		
0.60	♀	0.11	0.14	1.3	14.3
0.70	♀	0.36	0.47	1.3	14.9
0.80	♂	0.36	0.47	1.3	14.7
0.70	♀	0.22	0.33	1.5	14.2
0.90	♂	0.25	0.43	1.7	10.9
0.95	♂	0.18	0.32	1.8	17.1
0.60	♀	0.14	0.25	1.8	14.2
0.50	♂	0.07	0.21	2.9	15.9
0.80	♂	0.07	0.36	5.0	22.1
0.50	♀	0.29	1.81	6.3	12.5

Average 2.5 ± 0.4

0.2ml of 0.02M boric acid was added to 0.2ml of the blood (final boron concentration: $108 \mu\text{g/ml}$). Mixtures were incubated for 30 min. at 30°C and pH 6.6.

Methemoglobin determinations were performed by Evelyn-Malloy method⁷⁾.

* MeHb: methemoglobin

** Hb: hemoglobin

て同様な方法でメトヘモグロビン量を測定した。その結果は Table V に示すとおり、ホウ素投与量が 100mg/kg 以上で有意の差がみられ対照の 2.6~5.5 倍のメトヘモグロビンの生成増加が認められた。

III. ホウ酸塩添加ならびに投与後の赤血球内での嫌氣的解糖

1) ホウ酸塩添加による赤血球内での嫌氣的解糖
新鮮血液から分離した赤血球 0.3ml を用い、 $0.04M$

Table IV Methemoglobin Levels in Erythrocyte after Addition of Borate to Guinea Pig's Blood (2)

Weight (kg)	Sex	Amount of methemoglobin (g/dl)		Ratio of MeHb form (B/C)	Amount of Hb (g/dl)
		Control (C)	Boron added (B)		
0.90	♂	0.25	0.54	2.2	11.3
0.70	♂	0.43	1.10	2.4	15.7
0.95	♂	0.18	0.43	2.4	17.0
0.80	♂	0.28	0.87	3.1	13.5
0.80	♂	0.07	0.36	5.0	21.8

Average; 3.0 ± 0.5

The method of addition of borate (final boron concentration; $216 \mu\text{g/ml}$), incubation condition and methemoglobin determination were the same as Table III.

のホウ酸・炭酸一水素カリウム緩衝液 (pH 7.6) を解糖試験の反応液に加え (ホウ酸塩終末濃度 $0.01M$)、 38°C に 1 時間保ったのち、10% トリクロル酢酸で除蛋白した反応液について乳酸量を測定し対照と比較した。その結果は Table VI に示すとおりでグルコースの嫌氣的解糖作用は $0.01M$ ホウ酸塩によって著明に阻害され、その平均阻害率は 37.3 ± 4.3 (S.E) % であった。

2) ホウ酸塩投与後の動物の赤血球内での嫌氣的解糖
モルモットに $61.1 \sim 83.3 \text{mg/kg}$ のホウ素をホウ砂溶液として経口投与し、3 時間後に採血し分離した赤血球を用いて解糖試験を行ない、 38°C に 1 時間保ったのち 1) と同様に除蛋白した反応液について乳酸量を測定し対照と比較した。その結果は Table VII に示すとおりホウ酸塩投与後の赤血球での嫌氣的解糖作用は明らかに阻害されることが認められ、その平均阻害率は 20.7 ± 3.5 (S.E) % であった。

Table V Methemoglobin Levels in Erythrocyte after Administration of Borate to Guinea Pig

Weight (kg)	Sex	Boron Administ (mg/kg)	Amount of methemoglobin (g/dl)		Ratio of MeHb form (B/C)	Amount of Hb (g/dl)
			Control (C)	Boron administ (B)		
0.80	♂	62.5	0.02	0.02	1.0	28.9
0.70	♂	71.4	0.04	0.04	1.0	15.8
0.90	♀	61.1	0.07	0.11	1.5	20.2
0.90	♂	111.1	0.12	0.29	2.6	16.2
0.75	♂	133.3	0.11	0.29	2.7	17.5
0.80	♂	125.0	0.04	0.22	5.5	16.4

Methemoglobin levels were determined by the method as Table III, 3hrs after oral administration of borate in a single dose.

Table VI Inhibition of Anaerobic Glycolysis in Guinea Pig's Erythrocyte after Addition of Borate

Weight (kg)	Sex	Amount of lactate produced per ml in react. mixt.		Inhibition rate** (%)
		Control (μg)	Boron added* (μg)	
0.70	♂	34	26	23.5
0.65	♀	60	42	30.0
0.90	♂	60	40	33.3
0.80	♂	72	44	38.8
0.80	♂	56	30	46.4
0.70	♂	54	26	51.8

Average; $37.3 \pm 4.3\%$

Reaction mixture, the same as the Lepage's one⁵⁾, was incubated in Thunberg tube for 1 hr. at 38°C and pH 7.6.

After removing protein, lactate produced was determined by the method of Barker-Summerson⁶⁾.

* 0.01M borate (final boron concentration; 108μg/ml)

** Inhibition rate was represented in the rate of decrease of lactate production.

Table VII Inhibition of Anaerobic Glycolysis in Guinea Pig's Erythrocyte after Administration of Borate

Weight (kg)	Sex	Boron administ (mg/kg)	Boron in erythrocyte (μg/ml)	Amount of lactate produced per ml in react. mixt.		Inhibition rate (%)
				Control (μg)	Boron administ (μg)	
0.75	♂	66.7	13.8	62	52	16.1
0.90	♀	61.1	7.4	43	36	16.3
0.60	♂	83.3	14.2	90	76	15.6
0.80	♂	62.5	13.8	58	36	37.9
0.80	♂	62.5	13.6	48	38	20.8
0.70	♂	71.4	14.2	34	28	17.6

Average; $20.7 \pm 3.5\%$

Lactate was determined by the method as Table VI 3hrs. after oral administration of borate in a single dose.

考 察

投与ホウ素の一部は赤血球内に浸透することが認められたことから、ホウ酸塩投与後の赤血球でみられた嫌氣的解糖阻害は、赤血球内に浸透した投与ホウ素の影響によるものと考えられる。つぎに従来の知見によれば赤血球内に生じた酸素運搬能のないメトヘモグロビンは血中で随時酸素担体であるヘモグロビンに還元されるとされている。しかるに著者らは実験の結果、ホウ酸塩投与後の赤血球内にメトヘモグロビンの増加蓄積を認めた。これは赤血球内に浸透したホウ素の影響によるものとみなされるところから、このような酸素運搬能のないメトヘモグロビンの増加蓄積は血液に対するホウ素毒性に重要な関係があると考えられるが、ホウ素による赤血球内メトヘモグロビンの蓄積機構とホウ素による赤血球内解糖阻害との関連性については今後の検討にまたなければならない。

む す び

1. ホウ素の赤血球内浸透の有無、ホウ酸塩の赤血球内メトヘモグロビン生成に対する影響、ならびにホウ酸塩の赤血球内嫌氣的解糖作用に対する影響について、そ

れぞれホウ酸塩添加の場合とホウ酸塩投与の場合とについてモルモットの血液で検討した。

2. その結果ホウ素は赤血球内に相当の浸透性を有することが認められた。

3. ホウ素の血液添加または、経口投与により赤血球内メトヘモグロビンの生成増加が認められた。

4. ホウ酸塩は赤血球での嫌氣的解糖作用を著明に阻害することが認められた。

5. 血液に対するホウ素毒性を生化学的な見地から考察した。

文 献

- 1) 赤木満洲雄, 三沢隆行, 金島弘恭: 薬誌, **82**, 934 (1962).
- 2) M. Akagi, T. Misawa, H. Kaneshima: Chem. Pharm. Bull., **11**, 1461 (1963).
- 3) 同上: *Ibid.*, 投稿中.
- 4) 三沢隆行, 金島弘恭: 本誌, **9**, 10 (1963).
- 5) G. A. Lepage: J. Biol. Chem., **178**, 1009 (1948).
- 6) S. B. Barker, W. H. Summerson: *Ibid.*, **138**, 535 (1941).
- 7) K. A. Evelyn, H. T. Malloy: *Ibid.*, **126**, 655 (1938).