原著

δ-アミノレブリン酸およびその脱水酵素活性に 及ぼす鉛の効果に関する実験的研究

千葉 百子*, 菊池 正一*

EXPERIMENTAL STUDIES ON THE EFFECT OF LEAD ON δ-AMINOLEVULINIC ACID (ALA) AND ALA DEHYDRASE ACTIVITY

Momoko CHIBA† and Masakazu KIKUCHI†

Experimental studies on lead poisoning were carried out in rabbits, and the following findings were obtained.

1) Activity ratio, a new parameter for estimating lead exposure, was proposed and examined. The ratio was calculated from two kinds of δ-aminolevulinic acid dehydrase (ALAD) activity according to the next formula:
$$\text{Activity ratio} = \frac{\text{OD after heat treatment at } 60^{\circ}\text{C for 5 min}}{\text{OD before heat treatment}} \times 100.$$

It was ascertained that the ratio paralleled the degree of lead exposure.

2) Rabbits of experimental group were given single injection of 0.1 mg Pb/kg intravenously, in order to confirm the change of ALAD activity within relatively short time after lead injection. ALAD activity reduced to 80% after 10 minutes, and kept the minimum activity (10-12% against the value just before the injection) during 4-12th hour after injection. The activity after heat treatment showed, however, no substantial difference between the control and Pb groups. The activity ratio, therefore, was much higher in Pb group than in the control group.

To explain these phenomena, two components of ALAD were postulated, i.e. the one is originally active and sensitive to lead *in vivo* (Type I), and the other is activated by heat treatment and insensitive to lead *in vivo* (Type II).

3) Three groups of rabbits were given repeated intravenous Pb injections every day for two weeks. In the group received the minimum dose (total 0.1175 mg Pb/kg) ALAD activity decreased, but it recovered soon after the termination of Pb injection. In the group received the maximum dose (total 11.75 mg Pb/kg), the activity was markedly inhibited and recovery of the activity was very slow. The minimum Pb dose that causes a measurable decrease of ALAD activity was estimated at 2.5-10 μg Pb/kg/day in repeated injections for 2-3 days. In the case of repeated injections for two weeks, Pb dose at which dose-response relationship was observed between injected Pb and ALAD activity was estimated under 0.5-1.0 mg Pb/kg/day. The recovery of ALAD activity in rabbits received those amounts of Pb was relatively rapid.

4) Three groups of rabbits were given repeated Pb injections intravenously for 2-3 weeks, in order to determine ALA concentrations in the plasma, red blood cells and the urine as compared with ALAD activity. ALA both in the blood and in the urine increased markedly in the group received high Pb dose (total 13 mg Pb/kg), but indistinctly in the groups received low Pb dose (total 0.19 and 1.7 mg Pb/kg). After termination of Pb administration, ALA of all the rabbits received Pb returned to the normal value rapidly, while ALAD activity remained low.

5) Values of the parameters from the normal rabbits were (mean ± SD): ALAD activity; 1.42 ± 0.26 μmoles PBG/ml RBC/hr, 35°C ($n=74$), the activity after heat treatment; 0.41 ± 0.11 μmoles

* 順天堂大学医学部衛生学教室
昭和49年7月29日受付

† Department of Hygiene, Juntendo University, School of Medicine
Received for publication July 29, 1974

PBG/ml RBC/hr, 35°C ($n=74$), activity ratio; 31 ± 10 ($n=74$), ALA in plasma; 0.024 ± 0.010 mg/dl ($n=18$), ALA in red blood cell; 0.128 ± 0.044 mg/dl ($n=17$), ALA in the urine; 0.74 ± 0.34 mg/liter ($n=20$), and creatinine in the urine; 0.92 ± 0.35 g/liter ($n=18$). The ratio, ALA (mg/liter)/creatinine (g/liter), was 0.67 ± 0.48 ($n=18$).

I. はじめに

鉛中毒に関する研究は古くからなされており、貧血、好塩基斑点赤血球の出現、コプロポルフィリンおよびδ-アミノレブリン酸 (ALA) の尿中排泄の増加、さらに最近では、δ-アミノレブリン酸脱水酵素 (ALAD) の活性低下が報告されている。現在、ALAD は生体に対する鉛の作用を最も早期に、最も鋭敏に反映するとされており、かつ血中 ALAD 測定は比較的手技が簡単で、再現性がよい等の点で優れているので、鉛作業従事者の検診に末梢血中 ALAD 活性測定がとり入れられている。いままでにも動物を使用した鉛中毒に関する実験的研究は多数報告されているが、その多くはかなり多量の鉛を投与している。しかし現在では職場環境の改善および労働者の意識の向上等により、重篤な鉛中毒は減り、むしろ公害意識の昂揚に伴い、低濃度暴露が問題とされるようになってきている。今回われわれはウサギを使用し、鉛を静脈内に投与した場合、ALAD 活性に影響を及ぼす最小鉛量の推定、ALAD 活性阻害鉛量投与後短時間内における ALAD 活性の経時的変化の観察、および連続投与の場合の ALAD 活性の変化ならびに血漿中、赤血球中および尿中 ALA 濃度の観察を行なった。これまでにわれわれは鉛によって低下した ALAD 活性が、その溶血血液の加温処理によって再び上昇し、同様に処理した鉛非暴露血液と同程度の活性を示すことをヒトとウサギにおいて認め、これを報告してきた¹⁻⁵⁾。すなわち加温処理後の ALAD 活性度は鉛暴露とほとんど無関係となる。そこで加温処理前後の活性度から“活性度比”という新たなパラメーターを算出し、鉛暴露の指標としての有効性について検討を行なった。

II. 実験材料ならびに実験方法

1. 実験材料

1) 使用動物

成熟雄性家兎を使用、実験期間中固型飼料と水を自由に与えた。飼育は気温 $22 \pm 1^\circ\text{C}$ 、気湿 $50 \sim 60\%$ に調節された室内で行なった。

i) 一回投与実験

体重 $3 \sim 4$ kg の家兎 13 羽を使用し、対照群 6 羽、鉛投与群 7 羽とした。

ii) 連続投与実験 (I)

体重 $2.5 \sim 5$ kg の家兎 16 羽を使用し、1 群 4 羽とし、A ~ D の 4 群に分けた。

iii) 連続投与実験 (II)

体重 $2 \sim 4$ kg の家兎 20 羽を使用し、1 群 5 羽とし、E ~ H の 4 群に分けた。

2) 投与鉛溶液の調製

鉛として酢酸鉛 $[\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 3 \text{H}_2\text{O}]$ を使用した。溶媒はすべて 5% グルコースとし、投与液量が 0.5 ml/kg となるよう調製した。この溶液は投与に先だって、ザイツ濾過器を通した。

3) 投与方法と投与量

投与方法は耳静脈内投与とした。対照群にはすべて 5% グルコースを投与した。

i) 一回投与実験

鉛投与群には 0.1 mg Pb/kg を投与した。

ii) 連続投与実験 (I)

Table 1 に示したように、A 群は対照群とし、B 群は 0.01 mg Pb/kg、C 群は 0.1 mg Pb/kg、D 群は 1.0 mg Pb/kg を 1 日 1 回投与した。通算投与回数は A および B 群 19 回、C 群 17 回、D 群 13 回である。

iii) 連続投与実験 (II)

Table 2 に示したように、E 群は対照群とし、F ~ H 群は、はじめの 3 日間はそれぞれ 0.0025、0.025 および 0.25 mg Pb/kg を、4 ~ 14 日目まではそれぞれ 0.010、0.10 および 1.0 mg Pb/kg を投与した。したがって各群とも、14 日間の連続投与とした。

2. 試料の採取ならびに調製

1) 血液試料

分析に必要な血液は耳静脈から採血した。血液試料の調製方法の概略を Fig. 1 に示した。すなわち一部はそのまま ALAD 測定用全血試料としてあらかじめ準備したヘパリン処理試験管に直接メランジュールで測りとり別にヘマトクリット値 (Ht) を測定した。その他の血液試料は必要量のヘパリンを入れてある目盛付スピッツ管に全血約 5 ml をとり、冷却遠心 (0°C , 3,000 rpm, 5 分) し、上清を血漿中 ALA 測定用試料とし、沈澱は冷生理食塩水で 3 回洗い、最後の沈澱を再び冷生理食塩水に浮遊させ、この状態での Ht 測定用試料をとった後に、ドライアイスで溶血させ、赤血球中 ALA 測定用試料および洗浄赤血球 ALAD 測定用試料とした。連続投与期間中の採血は、その日の鉛投与の前に行なった。

Table 1. Pb dose and number of times of the repeated lead administration (I).

Group	Pb Dose	Number of times of administration
A	Control (5% glucose)	19
B	10 $\mu\text{g/kg/day}$	19
C	0.1 mg/kg/day	17
D	1.0 mg/kg/day	13

Table 2. Pb dose in the repeated lead administration (II).

Group	Pb Dose	
	1st—3rd day	4—14th day
E	Control (5% glucose)	
F	2.5 $\mu\text{g/kg/day}$	10 $\mu\text{g/kg/day}$
G	25 $\mu\text{g/kg/day}$	0.1 mg/kg/day
H	0.25 mg/kg/day	1.0 mg/kg/day

Fig. 1. Preparation of blood samples.

2) 尿試料

ウサギをメタボリックケージに1羽ずつ入れ、24時間の自然尿を集めた。ウサギの尿はpHが高く、採尿中にALAが分解する可能性を考慮して、尿受器中にあらかじめ20%酢酸10mlを加えておき、尿回収時の尿量測定の際にこれを補正した。尿は濾紙で濾過してから尿中ALAおよび尿中クレアチニン測定用試料とした。

3. 測定方法

1) 血中ALAD活性度測定方法

i) 方法

全血および洗浄赤血球中ALAD活性度測定方法は小山内⁶⁾および和田ら⁷⁾の方法を応用した。その概略をFig. 2に示した。ALAD測定用試料はただちにドライアイスで凍結し、30~45分後に20°C水浴中で融解し、

溶血した。その後incubationまでの操作はice bath中で行なった。リン酸緩衝液(0.5M, pH 7.4)を加え、加温処理を施す試料についてはこの状態で、60°C水浴中で5分間振盪し、ただちにice bath中へもどし、以降の操作を行なった。すなわち基質溶液を加え、35°C水浴中で1時間incubateする。トリクロール酢酸(TCA)で反応を停止させ、遠心上清(3,000rpm, 10分)にmodified Ehrlich's reagent添加後、正確に15分後に556m μ における吸光度(OD)を測定した。分光光度計は日立UV-VIS 139型を使用した。ALAD活性度測定はduplicateで行ない、その平均値を採用した。Ht測定は毛細管法を採用した。

ii) ALAD活性度単位

赤血球1ml中のALADが35°C、1時間に形成した

Fig. 2. Measurement of ALAD activity. §: Processing in ice bath.

ポルフォビリノーゲン (PBG) の μmole で表わした。すなわち前述の測定方法にしたがって得た OD と PBG のモル吸収係数 6.2×10^4 および Ht から次式で得られる。

ALAD 活性度 ($\mu\text{mole PBG/ml RBC/hr}$, 35°C)

$$= \frac{\text{OD} \times 1000}{\text{Ht}} \times 0.077$$

2) 血漿中および赤血球中 ALA 測定方法

Haeger-Aronsen の血清中 ALA 測定方法⁸⁾を一部改良して応用した。その概略を Fig. 3 に示した。原法とのおもな相異点は、(1)原法では血清 3 ml を使用しているが、われわれは血漿または溶血赤血球溶液 2 ml を使用した。さらに TCA 濃度 20% を 35% に代えた。これは血漿中 ALA 濃度が著しく低い、経日的採血であるため 1 回採血量を大量にすることができないので、これに代わって被験血液の TCA 溶液による希釈を可及的小くするためである。(2)ALA からピロール環形成のために原法ではアセチルアセトンを使用しているが、われわれはアセト酢酸エチルを使用した。これに伴い酢酸緩衝液をリン酸緩衝液 (0.1 M, pH 6.8) に代えた。これはアセト酢酸エチルとアセチルアセトンとではピロール環形成時の至適 pH が異なるためである。血漿中または赤血球中 ALA 測定のためにはアセチルアセトンでもアセ

ト酢酸エチルでも測定値にほとんど差はないが、後述の尿中 ALA 測定時に以前からアセト酢酸エチルを使用していたため、この場合にも測定の原理はまったく同じであるので共通の試薬を使用した。(3)エーリッヒ試薬は小山内⁶⁾記述の処方を採用した。この処方ではエーリッヒ試薬添加後の呈色および褪色までの時間、呈色の強さ等の点を改善するため、少量の塩化水銀が加えられている。今回の一連の実験では、本項目以外にも前述の ALAD 活性度測定および後述の尿中 ALA 測定の際、エーリッヒ試薬を使用するので、各項目ごとに異なった処方のものを使用することによる煩雑さや、誤りを防ぐために、すべて同一処方のものに統一し、小山内⁶⁾記述のものを使用した。

血漿および赤血球中 ALA 測定時には一定量の ALA standard solution を血漿または赤血球浮遊液を溶血させたものに添加した試料 (ALA 0.05 mg/dl) について同時に分析を行ない、calibration を行なって血漿 100 ml 中の ALA mg と、赤血球中 ALA については Ht で補正し、赤血球 100 ml 中の ALA mg を算出した。この方法で同一試料について求めた変動係数 (CV) は、血漿中 ALA 3.6% ($n=8$)、赤血球中 ALA 10.8% ($n=10$) であった。

Fig. 3. Measurement of ALA in plasma or RBC.

3) 尿中 ALA 測定方法

和田ら^{7,9)}の方法を使用した。ただしエーリッヒ試薬は前述のように小山内⁶⁾記述のものを使用した。尿 2 ml の sampling は各ウサギごとに測定した尿量から、受器中にあらかじめ加えておいた酢酸の割合を算出し、尿として 2 ml となるように試料をとり、次の 20% 酢酸を加える操作でその試料中にすでにはかり込まれた酢酸量を調整した。尿中 ALA 測定時には、同時に検量線を作製し、尿 1 l 中の ALA mg を算出した。この方法を使用して同一試料について求めた CV は 5.3% ($n=10$) であった。

4) 尿中クレアチニン測定方法

Jaffe の反応¹⁰⁾を使用した。尿試料の sampling は ALA 測定時と同様、尿として 0.1 ml となるように採り、蒸留水で 200 倍希釈した。この場合にも同時に検量線を作製し、尿 1 l 中のクレアチニン g を算出した。この方法を使用して同一試料について求めた CV は 4.1% ($n=10$) であった。

尿試料はあらかじめ 20% 酢酸を添加したことによって、クレアチニン値は影響されないことをあらかじめ確認した。また仮にクレアチニン分解微生物が存在したとしても pH を酸性に保っておけば、その影響を受けにくいので¹¹⁾、酢酸の添加はの場合にも好つごうである。

III. 結 果

1. 1 回投与実験

ウサギに 0.1 mg Pb/kg 静注後、10, 30分, 1, 2, 4,

6, 8, 12 および 24 時間の全血および洗浄赤血球中 ALAD 活性度を測定した。60°C 5 分処理後の活性度は対象群 4 羽および鉛群 3 羽のみについて測定した。この実験に使用したウサギ 13 羽の投与前の ALAD 活性度は平均 1.6 (1.31~1.84) μ moles PBG/ml RBC/hr, 35°C であった。

Fig. 4 に全血の ALAD 活性度の経時変化を各ウサギの投与前直前値を 100% として各時点の測定値を投与前値に対する割合として示した。対照群の平均値は実験期間中 90~102% で比較的安定していた。これに対して鉛群では 10 分後にその平均値が 80% に低下し、対照群より有意に低値であった ($p<5\%$)。投与後 4~12 時間が最低値となり、投与前の 10~12% (平均) を示し、24 時間にはやや回復のきざしがみられ平均 23% であった。

全血の加温処理後の活性度を Fig. 5 に示した。非処理全血の活性度は上記のとおり 2 群間に大きな差が認められたにもかかわらず、加温処理後には鉛投与の有無にも、投与後の経過時間にも関係なく、ほぼ一定範囲内にとどまった。

個々のウサギについて次式に従って活性度比を算出し、Fig. 6 に示した。

$$\text{活性度比} = \frac{60^\circ\text{C, 5分処理後の OD}}{\text{加温処理しない場合の OD}} \times 100$$

Fig. 4 および Fig. 5 から明らかなように、対照群の ALAD 活性度は加温処理による低下の程度が常にほぼ一定であるので、活性度比はほぼ一定値を維持する。鉛

Fig. 4. ALAD activity of the whole blood of rabbits in the single lead administration.

○ control rabbit, — mean value of control rabbits.
● Pb rabbit, mean value of Pb rabbits.
* per cent against the value just before Pb administration.

Fig. 5. ALAD activity of the whole blood of rabbits after heat treatment in the single lead administration.

* unit: $\mu\text{moles PBG/ml RBC/h}$, 35°C .

群では、ALAD 活性度は鉛投与後著しく低下するのに対して、加温処理後の活性度は終始ほとんど変化しないため、活性度比は上昇し、活性度が低い時期ほど活性度比は大となる。

なお本実験において、採血の都度 Ht を測定したが、終始大きな変化は認められなかった。したがって活性度比はただちに OD の比として算出して実際上さしつかえない。

また、ALAD 活性は血液試料に *in vitro* で鉛を添加した場合、その添加量に応じて低下することが知られている。われわれの *in vitro* 鉛添加実験の結果を Table

3 に示した。これは酢酸鉛をトリス塩酸緩衝液 (0.2 M , $\text{pH } 7.4$) に溶解して加え、incubation 時の鉛濃度として示したものであり、 10^{-9} M の鉛で ALAD 活性は阻害されている。今回の実験で投与した鉛量が循環血中でのくらの濃度になるかを、ウサギの体重の10%を循環血とし、投与鉛がすべて全血中に存在すると仮定して計算すると、約 $5 \times 10^{-6}\text{ M}$ となるので、incubation 時には $2.5 \times 10^{-6}\text{ M}$ となり、これは明らかに *in vitro* で鉛を添加した場合に、ALAD 活性を阻害する濃度である。そこで洗浄赤血球について活性度測定を試み、その結果を Table 4 に示した。Table 4 から明らかなよう

Fig. 6. Activity ratio of each rabbit in the single lead administration.

$$* \text{ Activity ratio} = \frac{\text{OD after heat treatment}}{\text{OD before heat treatment}} \times 100.$$

Table 3. Effect of lead on ALAD activity *in vitro*.

Lead acetate was added in the mixture of 0.2 ml human hemolysate, 0.1 ml substrate solution and 0.1 ml pH 7.4, 0.2 M tris-HCl buffer, incubated at 38°C for one hour. Pb concentration is expressed by the final weight of incubation mixture.

	Pb concentration			
	Control	$2.9 \times 10^{-10} \text{ M}$	$2.9 \times 10^{-9} \text{ M}$	$2.9 \times 10^{-8} \text{ M}$
ALAD activity	100%	103%	86%	55%

Table 4. ALAD activity of washed red blood cells before and after heat treatment in the single lead administration.

Heat treatment	Control group						Pb group					
	Before			After			Before			After		
Time after injection	<i>n</i>	mean	SE	<i>n</i>	mean	SE	<i>n</i>	mean	SE	<i>n</i>	mean	SE
0	6	1.18	0.11	4	0.58	0.07	7	1.23	0.16	3	0.79	0.17
10 min	4	0.65	0.09	4	0.53	0.06	5	0.87	0.20	3	0.40	0.03
30 min	6	1.06	0.19	4	0.57	0.07	7	0.66	0.07	3	0.78	0.02
1 h	6	1.05	0.12	4	0.54	0.06	7	0.48	0.11	3	0.27	0.06
2 h	6	1.23	0.08	3	0.40	0.04	5	0.13	0.04	3	0.27	0.04
4 h	6	1.11	0.19	4	0.50	0.02	5	0.06	0.03	3	0.32	0.06
6 h	6	1.04	0.18	4	0.58	0.08	7	0.11	0.05	3	0.35	0.08
8 h	4	0.90	0.10	4	0.62	0.07	3	0.04	0.03	3	0.32	0.06
12 h	4	1.01	0.20	3	0.79	0.06	3	0.10	0.04	3	0.60	0.12
24 h	6	1.13	0.07	4	0.71	0.06	6	0.33	0.04	2	0.60	0.06

に、各測定時点内でのバラツキが非常に大きく、満足できる結果は得られなかった。バラツキが大きい原因の一つとして incubation 時の酵素量対基質量のアンバランスが考えられる。われわれが通常使用している基質溶液は ALA 0.086 M であるが、0.86 M にした場合、完全に ALAD 活性は阻害される現象を認めている。substrate inhibition の現象は友国の報告¹²⁾の中にも窺える。洗浄赤血球の溶血させる直前に測定した Ht は、かなりのバラツキがあったので、これはそのまま酵素量対基質量のアンバランスとなり、測定結果のバラツキの原因となったものではないかと考えられる。

洗浄赤血球中 ALAD 活性度は投与後10分には対照群との間に有意な差は認められず、むしろ平均値は対照群のほうが低い結果となった。投与後30分には $p < 2.5\%$ で、1時間には $p < 0.5\%$ で、2時間には $p < 0.1\%$ で、それぞれ対照群より有意に低下しており、全血での観察と同じ傾向を示した。洗浄赤血球での加温処理後の ALAD 活性度も、加温処理前同様バラツキが大きかったが、全体的な傾向は全血の場合と類似していた (Table 4)。

これらの実験から、ウサギに *in vivo* 投与した鉛が、あたかも *in vitro* で血中に添加した場合のごとくに ALAD 活性を阻害するものか否かははっきりした裏付けは得られなかった。

なお、和田らの報告⁷⁾では、正常人および ALAD 活性の低下している鉛暴露者各5名の血液について、全血と2回洗浄赤血球を使用して、ALAD 活性度の比較を行なった結果、常に洗浄赤血球が高活性を示し、その比

は正常人および鉛暴露者血液ともに平均1.5である。われわれもウサギおよびヒト血液で1回洗浄赤血球の活性度が全血のそれより常に高い現象を認めていたが、今回の実験のみ、Ht のバラツキを考慮に入れてもすべてのウサギ血液で、ほとんどすべての時点で全血の活性度のほうが高い結果を得た。この原因としては、今回の実験のみ赤血球を3回洗浄したこと、および洗浄用生理食塩水に血球膜の保護剤を加えなかったこと等が考えられる。

2. 連続投与実験 (I)

Table 1 に示した鉛量をはじめの11日間は連続的に投与し、以後は2日休止、5日連続投与のくり返しとした。当初の実験計画では各群とも投与回数を同じくし、より長期間の連続投与を行なう予定であったが、これらの投与量では死亡するものや、高度の便秘症状を示すものが現われたので、漸次投与中止を余儀なくされた。投与期間中、B群では14回投与後、C群では16回投与後、D群では11回および13回投与後、各1羽が死亡した。

個々のウサギについて、ALAD 活性度、血漿および赤血球中 ALA ならびに尿中 ALA とクレアチニンを測定した。

1) ALAD 活性度について

鉛投与開始前に各動物について ALAD 活性度を3回測定し、その平均値をそのウサギの投与前値とした。投与後の ALAD 活性ははじめの3週間は2～3日に1度、以後は適宜測定の間隔を広げた。測定結果をA群 (対照群) の平均値に対する各群の平均値の割合 (%) として Fig. 7 に示した。各群内の個体差によるバラツキは比較的小さかった。CおよびD群では1回投与後すでにA

Fig. 7. ALAD activity of rabbits in the repeated lead administrations (I).

Fig. 8. ALA concentration in the plasma of rabbits of the repeated lead administrations (I).

* $p < 5\%$, ** $p < 1\%$.

群に対して有意に低下したが ($p < 0.1\%$), B群ではかなりの低下は示したものの有意でなく, 3回投与後にはじめて有意となった ($p < 1\%$). 投与期間中の ALAD 活性は, B群は8回投与以降, C群は6回投与以降, D群は1回投与以降に, それぞれ対照群の 45~50%, 10%, 1~3%と一定レベルを維持し, 投与鉛量と ALAD 活性度のレベルとの間に明らかに dose-response の関係が認められた. 投与中止後の活性度は, B, C群では比較的速やかに回復し, B群は中止後4日に, C群は23日にA群との間に有意な差が認められなくなった. しかしD群では投与中止後もその回復はきわめておそく, 18ヵ月後にもなおA群の62%にとどまっている.

2) 血漿および赤血球中 ALA について

血漿および赤血球中 ALA はおおむね1週間に1度測定した. その結果各群の平均値±標準誤差を血漿中 ALA について Fig. 8 に, 赤血球中 ALA について Fig. 9 に示した. 両 ALA ともにB, C群は実験期間中を通してA群より有意な高値は示さなかったのに対して, D群のみが著しい上昇を示した. D群の血漿中 ALA は投与6日後から高値を示すが, この時点では有意でなく, 連続投与の終了時が最も高く, 投与中止後2週間まで有意に高値を示し, 中止後3週間以降には他群と差がなくなった. D群の赤血球中 ALA は, 血漿中 ALA と並行して変化した, 連続投与終了時の測定結果の平均値は非常に増大しているが, 例数が少なく, 非常に分散が大きいため, 統計的に有意な差は認められなかった.

3) 尿中 ALA について

尿中 ALA の測定は血中 ALA 測定と同じ日に行なった. 各群ごとの平均値±標準誤差を Fig. 10 に示した. A群とB群は実験期間中, ほとんど変化を示さなかった. C群とD群はその平均値は明らかに上昇したが, 例数が少なく, バラツキが大きいため, 対照群に対していずれも統計的に有意な差は得られなかった.

尿量の個体によるバラツキが大きいため, 同時に測定したクレアチニン量で補正を試み ALA (mg/l)/クレアチニン (g/l) を算出してみたが, とくに尿量補正にまさる知見は得られなかった.

3. 連続投与実験 (II)

Table 2 に示したように鉛を14日間連続投与した. 投与前に ALAD 活性度を2回測定し, その平均値をそのウサギの投与前値とした. 投与開始後 1, 3, 7, 10, 14, 21, 30, 38, 48, 77 および 189 日に採血し, ALAD の加温処理前後の活性度を測定した. 今回の実験では, 投与開始後7日にE群1羽, 48日後にF群1羽が死亡した. G群1羽は45日ごろから平衡感覚の障害と思われる症状を示したので48日後の採血の後に屠殺した. 77日から189日の間にさらにE群1羽およびH群1羽が死亡した.

1) ALAD 活性度について

個々のウサギの ALAD 活性度を各群別にまとめ, Fig. 11 (a)~(d) に示し, 各群の平均値をE群の平均値に対する割合として Table 11(e) に示した. F群では $2.5 \mu\text{g Pb/kg/day}$ を3回投与後にも ALAD 活性度はほとんど影響を受けないが, 4日目以降 $10 \mu\text{g Pb/kg/}$

Fig. 11. ALAD activity of each rabbit and mean value of each group against the control group in the repeated lead administrations (II).

* unit: μ moles PBG/ml RBC/h, 35°C,
 ↔ period of Pb administration.

day の4回投与後には有意に低下した ($p < 0.5\%$). G, H群では1回の投与でE群に対して有意な低下を示した ($p < 0.1\%$). 投与中止後の活性度回復は、とくにF群で速やかであり16日以降はE群との間に有意差は認められなくなった。G群は徐々に回復し、2カ月後にはまだE群に対して有意に低値であるが ($p < 2.5\%$), 6カ月後には差は認められなくなった。H群の回復は非常に緩慢であり、6カ月後にもなおE群に対して有意に低値を示している ($p < 5\%$).

実験(II)においても、実験(I)の場合と同様に投与鉛量とALAD活性度レベルとの間にdose-responseの関係が観察された。しかし実験(I)(II)は鉛投与量および投与期間が類似しているにもかかわらず、(II)における死亡例、便秘例は(I)より少数であったこと、および(I)のほうが鉛投与終了後のALAD活性度の回復が(II)より早かったことが相違している。両実験に使用したウサギの平均体重は実験開始時(I) 3.2 ± 0.36 (SD) kg ($n=16$), (II) 2.9 ± 0.40 (SD) kg ($n=20$)であり、体重による差とは考えられない。したがって両実験におけるこれらの違いの原因として、たんなるウサギの個体差あるいは、(II)においてはあらか

じめ低濃度3回投与の後に高濃度投与としたことの影響の両者が考えられる。

2) 加温処理後のALAD活性度について

60°C, 5分処理後のALAD活性度の各群ごとの平均値をFig. 12に示した。投与開始後7日までは各群間に差はないが、10日にG, H群が、14日にすべての群がE群より有意に低値を示した ($p < 5\%$)。投与中止後約1カ月および2カ月目の測定時にはH群のみがE群に対して有意に低値であった ($p < 5\%$)。すなわち、連続投与実験では、比較的低濃度の鉛量でも投与を反復すると加温処理による活性度上昇も対照群に比して低いという現象が認められた。投与中止後はとくに高濃度投与群でこの現象はしばらく持続したが、活性度レベル自体よりは早期に対照群との間に差が認められなくなった。

3) 活性度比について

各ウサギごとに活性度比を求め、その各群ごとの平均値をFig. 13に示した。上記のように、この程度の鉛連続投与の場合、加温処理後の活性度がある程度低下するにもかかわらず、この場合にも投与鉛量と活性度比の間にdose-responseの関係は認められた。とくに最高濃度投与群の活性度比は著しく高く、投与中止後もかなり

Fig. 12. ALAD activity after heat treatment in rabbits of the repeated lead administrations (II).

↔ period of Pb administration.

* unit: $\mu\text{moles PBG/ml RBC/h}$, 35°C .

Fig. 13. Mean activity ratio in rabbits of the repeated lead administrations (II).

長期間他群よりも明らかに高値を維持し、活性度比は鉛暴露の程度と密接な関係のあることを示した。

IV. 考 察

1. ウサギの ALAD 活性度および血漿中、赤血球中、尿中 ALA の正常値について

正常ウサギの末梢血中 ALAD 活性度はヒト、マウスおよびラットのそれより高く、個体によるバラツキは比較的小さい。別個に購入した3群のウサギ74羽について、ALAD 活性度、加温処理後活性度のそれぞれ第一回測定の結果、および活性度比、ならびに活性度測定時の

体重を、各群別および全個体総計について、最大値、最小値、平均値、標準偏差および変動係数を Table 5 に示した。体重と ALAD 活性度との間にはまったく無相関であった。これらの平均 ALAD 活性度 $1.42 \mu\text{moles PBG/ml RBC/hr}$, 35°C 、および加温処理後の活性度 $0.41 \mu\text{moles PBG/ml RBC/hr}$, 35°C はウサギの正常値とみなせると考えられる。

正常ウサギの血漿中 ALA は 18 例について測定した。その平均値 $\pm\text{SD}$ は $0.024 \pm 0.010 \text{ mg/dl plasma}$ (range $0.008 \sim 0.033$) であった。同時に測定した赤血球中 ALA 17例の平均値 $\pm\text{SD}$ は $0.128 \pm 0.044 \text{ mg/dl}$

Table 5. ALAD activity before and after heat treatment, activity ratio and body weight of intact rabbits.

Group	Body weight (kg)				ALAD activity* Before heat treatment				ALAD activity* After heat treatment				Activity ratio			
	1	2	3	total	1	2	3	total	1	2	3	total	1	2	3	total
<i>n</i>	24	21	29	74	24	21	29	74	24	21	29	74	24	21	29	74
max.	3.6	3.4	4.3	4.3	2.18	1.78	1.67	2.18	0.66	0.57	0.75	0.75	30	44	64	64
min.	2.4	2.1	1.9	1.9	1.09	0.91	0.76	0.76	0.26	0.24	0.25	0.24	17	19	21	17
mean	3.0	2.8	3.3	3.1	1.51	1.35	1.25	1.42	0.37	0.38	0.46	0.41	25	29	38	31
SD	0.3	0.4	0.6	0.5	0.23	0.24	0.23	0.26	0.08	0.10	0.12	0.11	3	8	10	10
CV(%)	10	14	19	17	15	18	18	19	22	26	27	28	13	26	27	31

* unit: μ moles PBG/ml RBC/hr, 35°C

RBC (0.033~0.207) であった。

正常ウサギの尿中 ALA は 20 例の 平均値 $\pm$ SD は 0.74 ± 0.34 mg/l (range 0.19~1.17) であった。これらについてクレアチニン比を求めたところ 0.81 ± 0.54 (0.23~1.17) であった。Haeger-Aronsen⁹⁾によればウサギの尿中 ALA の正常値は 0.03 ± 0.02 (SD) mg/dl, すなわち平均 0.3 mg/l, クレアチニン比 0.67 ± 0.48 (SD) であるとしており, 今回のわれわれの値は, これに比していくぶん高い結果であった。

2. 鉛による ALAD 活性の阻害について

鉛が血液中に侵入すると ALAD 活性度は速やかに低下しはじめる。侵入した鉛は10分後にはすでに赤血球中の ALAD を阻害しているものと考えられる。投与後2時間までの活性度の低下は直線的で, 急激であるが, これは赤血球中にとり込まれる鉛量が増加するため, それに応じて活性の阻害も増大するものと考えられる。投与後4~12時間が最低値を示す。Bonsignore ら¹³⁾の鉛一回投与後の ALAD 活性の観察では, 皮下注射であるにもかかわらず投与後1, 4, 8時間が最低値を維持しているが, これは彼らの投与鉛量が 5, 15, 50 mg/kg と多量であるため, 投与後最低値に達するまでの時間が短かったと考えられる。いずれにしても投与した鉛が赤血球中の ALAD に影響を及ぼすまでの時間はかなり短いことが窺われる。投与24時間後にはいくぶん回復を示していることはわれわれの結果と一致している。

連続的に鉛を静注した場合, 2.5 μ g/kg/day では3日間連続投与しても ALAD 活性はまったく影響されなかった。10 μ g/kg では一回の投与で活性低下をきたした。したがって ALAD 活性に影響を与える最少鉛量は 2.5~10 μ g/kg の間にあると推定できる。De Bruin¹⁴⁾は 5~10 μ g/kg の間にあると報告しているが, その報告では投与鉛量は5および10 μ g/kg の2群のみで使用

ウサギは各群2羽であり, 対照群をおいていない。ALAD 活性度低下をきたす鉛の最小限界量については今後さらに正確な見積りを可能とするため検討の要がある。

連続投与実験 (I) と (II) において, ALAD 活性が投与鉛量に応じた一定レベルを維持するという一種の dose-response の関係が観察された。これは鉛の投与量対排泄および臓器への沈着量との間に平衡関係が成立し, 血中鉛量がほぼ安定し, このために ALAD 活性が一定レベルを保つと考えられる。連続投与実験 (I) で, 鉛投与期間中, 投与を休止すると速やかに回復の傾向が現われることは, ALAD 活性と血中鉛量との間に密接な相関関係があるとされていることおよび上述の推定を裏付けるものと考えられる。

しかし連続投与実験 (I) (II) とともに最高濃度投与群では投与中止後, 活性度の回復は非常におそい。低濃度の鉛では連続投与しても ALAD 活性は回復するが, 高濃度の鉛では短期間投与でも回復しないことは Bonsignore ら¹⁵⁾も報告している。別に行なった0.5および1.0 mg Pb/kg の間歇的連続投与 (2 times/week) 実験では, ALAD 活性の低下は両群とも同程度であったが, 7回投与後の回復は1 mg Pb/kg 投与群より, 0.5 mg Pb/kg 投与群で明らかに速やかであった (Fig. 14)。ALAD 活性低下度からみた投与鉛量と ALAD 活性の dose-response の関係は, 2週間程度の連続投与の際, 鉛量 0.5~1.0 mg/kg/day 以下の場合に成り立つものと推定される。また2週間程度の連続投与の場合, 投与中止後, 速やかに活性回復のみられる最大鉛量も 0.5~1.0 mg/kg/day 以下にあると考えられる。

3. 加温処理後の ALAD 活性度について

正常ウサギの血中 ALAD は, 60°C, 5分の処理後にはその活性が約1/3に低下する (Table 5)。しかし鉛に

Fig. 14. ALAD activity in rabbits of the intermittent lead administrations.

↓ : Pb administration.

Each group consists of two rabbits.

より明らかに低下していた活性は加温処理によって上昇し、正常ウサギの加温処理後の活性度とほぼ同一レベルに達する。言い換えれば、加温処理後の ALAD 活性度は、鉛とほとんど無関係となる (Fig. 5, Fig. 12)。

鉛が ALAD 活性を低下させるメカニズムは第一に鉛による ALAD の必須 SH 基の障害があげられているが、これですべてを説明することはできず、現在十分に解明されていない。その他のメカニズムとして、鉛が ALAD のサブユニットの間隔を変えることも一つの可能性として考えられる。一方鉛によって低下していた活性が、加温処理後に上昇するが、鉛と SH 基の親和力の程度と、60°C、5 分という加温条件から考え合わせて、SH 基と結合して一時的に ALAD 活性を阻害していた鉛が追い出されることによって活性が上昇するものとは考えにくい。そこで次のような仮説をおけば上記の現象の説明が可能となる。すなわち ALAD は少なくとも二種の成分から成り、それらを Type I および Type II と仮定する。これらが isozyme であると断定しうるか否かは現在までのところ明確ではない。Type I は通常の ALAD 活性度測定法でその活性が測定され、かつ鉛によって阻害されやすい性質をもつ。またこの Type I はウサギの場合には熱によっても比較的安定である。Type II は通常の測定方法ではその活性は測定されえず、加温処理後にはじめてその活性が測定されうるかたちとなるものであり、鉛に対しては比較的安定であるとする。この仮説に基づいて実験結果の考察を試みると次のように説明することができる。鉛一回投与実験では Type I が鉛に阻害され、活性度は低下するが、Type

II がまったく無傷であるので加温処理後には対照群、鉛群の間に差は認められない。連続投与実験において、とくに最高濃度の鉛投与群で活性度の回復が非常におそいことおよび加温処理後の活性度が上昇はするが、他群より低いこと、ならびに比較的低濃度の鉛投与群でも連続投与期間の末期に加温処理後の活性度が対照群より低くなることは次のように説明できる。すなわち鉛の影響を受けやすい Type I が大部分不活性化されると、次に鉛は Type II も阻害する。したがって ALAD 活性はもちろん低下し、加温処理後の活性度もある程度低下を示す。そして Type II が無傷である間は Type I の回復が容易であり、したがって活性度の回復も速やかであるが、Type II も障害を受けると Type I の回復は困難となり、活性度の回復が遅れる。このように考えると ALAD はまず Type II が生合成され、Type II から Type I へ移行するものであるという考え方も可能であろう。連続投与実験 (II) の結果、すなわち鉛により低下した ALAD 活性度は、そのレベルの回復よりも、加温処理後活性度の回復のほうが早いという事実は、このことの裏付けの一つとなるであろう。

4. 鉛の血漿中、赤血球中および尿中 ALA に対する効果

比較的高濃度の鉛に継続的に暴露された場合、血漿中、赤血球中および尿中 ALA は増加する。これら三者間の増加の順序は実験的に観察できなかったが、おそらく ALA はまず赤血球中に増加し、それが血漿中に放出され、さらに尿中に排泄されるものと考えられる。血漿中 ALA 対赤血球中 ALA の存在比はおおむね 5 : 1 で

あるが、連続投与の末期に、血中 ALA が最高値に達した時点では、この比は約10:1となった。これはヘム合成経路から考えて、ALA を次の中間体 PBG に進める過程を担う ALAD の著しい阻害により、ALA の増加が、血漿中への放出を上回る結果、赤血球中に蓄積するものと考えられる。

V. お わ り に

生体は鉛に対してまず ALAD の活性低下という反応を示す。鉛量が一定量以上であると、赤血球中、血漿中および尿中 ALA 量が、おそらくこの順序で増加する。逆に生体から鉛の負荷がとり去られた場合、ALA 量の正常化、遅れて ALAD の活性度回復がみられ、この異常の程度と、持続時間は鉛量によって定まる。われわれはウサギを使用して、実験的にこのことを確認した。さらにわれわれは「活性度比」というパラメーターを導入した。活性度比は鉛暴露の程度を反映する (Fig. 6, Fig. 13)。ヒトについての実際的な応用の可能性についてはすでに報告した¹⁾。活性度比は全血を -70°C で約40日間、あるいは -20°C で約70日間保存した後にも明らかに鉛の影響を判別することが可能であることを確認してあるので、この面からも実際上有利である。

すでに報告したように、ヒト血液とウサギ血液とは加温処理に対する ALAD 活性のふるまいが異なるが、本質的には変りない¹⁾。ヒト血液における血中鉛量と活性度比の関係等に関しては、別に報告の予定である。

稿を終えるに当たり、順天堂大学医学部生化学教室、関根隆光教授のご教示、ならびに衛生学教室、田代明子助手、および青山陽子研究生のご協力に感謝いたします。

文 献

- 1) 千葉百子, 菊池正一: 溶血加温前後の δ -アミノレブリン酸脱水酵素測定による鉛暴露, 非暴露の判別方法の検討, 産業医学, 15: 656—657, 1973.
- 2) 千葉百子, 菊池正一: δ -アミノレブリン酸脱水酵素活性及び加温処理後の活性度に対する各種金属投与の影響, 産

業医学, 16: 226—227, 1974.

- 3) 千葉百子, 高橋珠江, 菊池正一: 熱による血中 ALAD 活性度低下の鉛暴露者, 非暴露者の差異, 日衛誌, 28: 99, 1973.
- 4) 千葉百子, 田代明子, 菊池正一: 各種金属投与のウサギ血中 ALAD 活性度に及ぼす影響と加温処理による活性度の修復, 日衛誌, 29: 140, 1974.
- 5) 千葉百子, 二島太一郎, 田代明子, 菊池正一: 加温処理による血中 ALAD 活性度変化の正常者及び鉛暴露者の差異, 日衛誌, 29: 141, 1974.
- 6) 小山内博: 鉛取扱作業者の特殊健康診断について, 労働の科学, 25(10): 32—34, 1970.
- 7) Wada, O., Yano, Y., Kurashina, S., Ono, T., Aoki, Y. and Toyokawa, K.: Simple methods for the determination of the δ -aminolevulinic acid (ALA) dehydrase activity in erythrocytes and the ALA concentration in urine to evaluated lead absorption, Asian Med. J., 13: 581—590, 1970.
- 8) Haeger-Aronsen, B.: Studies on urinary excretion of δ -ALA and other haem precursors in lead workers and lead intoxicated rabbits, Scand. J. Clin. Lab. Invest., 12, suppl. 47, 1960.
- 9) Wada, O., Toyokawa, K., Urata, G., Yano, Y. and Nakao, K.: A simple method for the quantitative analysis of urinary delta-amino levulinic acid to evaluate lead absorption, Brit. J. Industr. Med., 26: 240—243, 1969.
- 10) 金井 泉: 臨床検査法提要, VII-40, 金原出版, 東京, 1968.
- 11) Jones, F.: A note on 24-hour urinary creatinine estimations as an index of accuracy in 24-hour urine collection, J. Med. Lab. Technol., 21: 156—157, 1964.
- 12) 友国勝磨: 鉛の生体への影響に関する研究. II. 鉛作業者の赤血球中 ALAD 活性度に及ぼす pH の影響と活性度の評価, 第47回日本産業衛生学会第16回日本産業医協議会講演集, 164—165, 1974.
- 13) Bonsignore, D., Calissano, P. and Cartasegna, C.: Comportamento della δ -aminolevulinico-deidratasi nell' intossicazione sperimentale da piombo, Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 41: 443—446, 1965.
- 14) De Bruin, A.: Effect of lead exposure on the level of δ -aminolevulinic dehydratase activity, Med. Lavoro, 59: 411—418, 1968.
- 15) Bonsignore, D. and Cartasegna, C.: Ulteriori ricerche sul comportamento dell' ALA deidratasi eritrocitaria nel saturnismo sperimentale, Lavoro Umano. 18: 529—536, 1966.