原 著

赤血球の加齢と ALAD 活性

(第 1 報)

平 野 英 男*, 大 道 正 義*, 石 川 清 文*

ALAD ACTIVITY OF RED CELLS OF DIFFERENT AGES

(1st Report)

Hideo HIRANO†, Masayoshi OMICHI† and Kiyofumi ISHIKAWA†

Rabbit erythrocytes were fractionated into populations of young cells (top layer) and old ones (bottom layer) by centrifugation, based on the fact that the specific gravity of young erythrocytes was lower than that of old ones. Then, reticulocyte count and osmotic resistance of red cells were compared between both populations.

As a result, it has been obtained that many reticulocytes were found in the top layer, while none of those was found in the bottom layer. Furthermore, cells of the top layer were more resistant to hemolysis in the hypotonic media than those of the bottom layer. These findings suggested that the cell population of the top layer was young and that of the bottom layer was old.

In comparison between both populations, the mean value of ALAD activity of young cells was 2.6 times higher than that of old ones. The rate of decrease of ALAD activity after intravenous administration of lead was similar in both populations while the amount of decrease of ALAD activity in the young cells was 2 to 3 times higher than that of the old ones.

I. は じ め に

鉛による生体影響を評価する指標として、血中鉛 (Pb-B)、尿中デルタアミノレブリン酸や尿中コプロポリフィリンなどの測定が行なわれ、さらに鋭敏な指標として末梢血のデルタアミノレブリン酸脱水酵素 (ALAD) 活性の測定による評価が広く行なわれている。

著者らは、鉛職場作業者の健康診断 (健診) の指標として従来の健診項目に ALAD 活性の測定を加えて健診を進めてきた。そのなかで、ガラスの溶解窯の改修時に、一般職場と鉛職場の作業者が合同作業を行なったところ、前者の ALAD 活性の低下は著しいが後者の変動は少なく¹⁾、また、同様な作業で新人と経験者では、前者の ALAD 活性の低下が著明であった²⁾。続いて行なった動物実験でも、暴露初期に ALAD 活性の減少が著しいという結果を得た³⁾。

Pb-B と ALAD 活性との関係をみると、Pb-B が低値

の場合 ALAD 活性の分布範囲は大きい。この現象に個体の加齢が関係するかどうか検討を行なったが、個体の加齢と ALAD 活性との間に、関係は認められなかった⁴⁾。

今回、赤血球の加齢という面から ALAD 活性に差異が存在するか否か実験を試みた。その結果、幼若赤血球と老化した赤血球とでは、明らかに ALAD 活性値に差が存在することを認め、投与された鉛によって阻害される ALAD 活性の変動量にも差があることを知ったので報告する。

II. 実 験 方 法

赤血球は加齢するにつれて、比重は大きくなるという実験報告に基づき、遠心分別法を用いて低比重から高比重の赤血球に分け、続いて、分離した赤血球の老若について網赤血球の陽性率と赤血球抵抗試験によって判定する方法を用いた。

1. 実験動物

実験動物は 3.5~4 kg のウサギ 14 羽 (雄性 9 羽, 雌性 5 羽) を用いた。飼料は日本クレア製ウサギ・モルモット用固形飼料を与え、飲料水は水道水を自由摂取させ

* 千葉大学医学部衛生学教室

昭和53年6月28日受付

† Department of Hygiene, School of Medicine,
Chiba University

Received for publication, June 28, 1978

た。動物は購入後8週間前後経過の後実験に供した。

2. 測定試料

血液は1回約10 mlを耳静脈より採取した。血液凝固阻止剤はヘパリン(1万単位/ml)を用いた。ウサギ赤血球の寿命を60日⁵⁾とし、血液を60の分画に分け、その各分画を測定単位とすることにした。

まず、血液を平底試験管に注入し、 $2,000 \times g$, 30分間遠心する。沈降した血球部分を8分画し、分取した各分画を生理食塩液に浮遊せしめ、次いで各分画の浮遊液を内径3 mmの平底試験管に採り、 $2,000 \times g$, 20分間再遠心する。再遠心した各分画の血球部分の上部1/8を採り、生理食塩液に再浮遊せしめ測定試料とした。ただし最下層分画の試料は上部1/8, 下部1/8を測定試料とした。

8分画各層を用いない場合は、8分画の最上層の再遠心上部1/8を上部試料とし、最下層分画の再遠心下部1/8を下部試料とし、測定に用いた。

3. 鉛の投与

鉛は酢酸鉛を用い、5%五炭糖溶液として必要量を耳静脈より注射した。本液は用時調整した。

4. 血中 ALAD 活性の測定

前記のように、各分画より得る試料は微量であるため、板谷らの発表した Bonsignore 改良法⁶⁾に準じ、基質混液後の磷酸緩衝液を M/15 に、pH を 6.8 に調整した^{7,8)}。

5. 比重液による赤血球の比重分別

Danon と Marikovsky⁹⁾ の記載した di-*n*-butyl phthalate と methyl phthalate の混合により各種比重液を調整した。分別はヘマトクリット(Ht)毛細管に常法のごとく血液を採り、おのおの Ht 管の血液上部に各比重液を約 3 mm 重層し、 $15,000 \times g$, 5分間遠心分離したのち比重液の停止位置を読んだ。記録は比重液より下層の血球容積を全赤血球容積に対する割合(%)で示した。

6. その他の試験

Ht の測定は毛細管法を用い、網赤血球の染色は Wright 染色と超生体染色 Gilbert 法¹⁰⁾を、赤血球抵抗試験は Parpart 法¹¹⁾を用いた。

III. 実験結果

1. 若い赤血球と老赤血球

1) 比重液による分別

ウサギ赤血球を遠心後、比重液の停止位置より求めた14例の比重分布は1.110より1.086に及んだ。5例の比重分別曲線を Fig. 1 に示した。実験経過で採血をくり

Fig. 1. Density distribution of rabbit red cells.

Fig. 2. Osmotic resistance of young and old red cells, in hypotonic media.

○: young red cells (top layer obtained by centrifuge), ●: old red cells (bottom layer obtained by centrifuge)

返すと1.086より低比重の赤血球が現われてくる。ウサギ赤血球に比重差があることが示された。また、網赤血球は低比重の赤血球中に多量に存在したが、高比重の赤血球中には認められなかった。

2) 赤血球抵抗試験

遠心法によって赤血球が比重分別されるから、実験方法II-2に述べた方法によって得た上部試料と下部試料を用いて、赤血球抵抗試験を行なった。

4例の試験結果のうち、1例を Fig. 2 に示し、また、0.5%食塩溶液における溶血率を Table 1 に示した。上部試料は下部試料にくらべ、低張液に対し抵抗性が強く、とくに0.5%液の差が顕著であった。

3) 網赤血球の陽性率

Table 1. Rate of hemolysis of young and old red cells in 0.5% NaCl solution at pH 7.4. and 20°C, after 2hr.

Young red cell (Top layer) (%)	Old red cell (Bottom layer) (%)
0	49
0	42
0	27
2	50

Table 2. Comparison of ALAD activities of young and old red cells and the whole blood.

YRC	ORC	WB	Ht
2,500	715	1,500	42
2,387	1,176	1,820	45
2,429	875	1,314	42
2,200	1,144	1,628	44
2,794	2,142	2,200	38
2,640	1,282	1,644	37
3,136	1,336	1,850	38
3,333	1,208	1,870	40
3,138	769	1,169	39
2,588	1,287	1,714	42
3,900	2,558	3,243	37
2,922	938	1,675	40
2,745	968	1,389	41.5
3,220	1,171	1,957	46

ALAD activity: 10^{-3} μ moles PBG/ml RBC/hr

YRC: young red cells, ORC: old red cells, WB: whole blood, Ht: hematocrit

遠心操作上, 血漿および Buffy coat の除去を行なうが, そのさい一部の網赤血球の除去は免れえない。しかし, 上部試料中の網赤血球の陽性率は 30~95% に及んだが下部試料中には網赤血球は認められなかった。

以上のごとく, 遠心法を用いた赤血球の比重分別, 上部試料と下部試料の赤血球抵抗試験の結果, ならびに両者の網赤血球の陽性率からみて, 上部試料は若い赤血球 (young red cells), 下部試料は老赤血球 (old red cells) であるとした。

2. 赤血球の加齢と ALAD 活性

健康ウサギ 14 羽の上部試料, 下部試料, ならびに全血の ALAD 活性を Table 2 に示した。上部試料の ALAD 活性は 3,900~2,200 の範囲で, 下部試料は

Fig. 3. Relationship between aging red cells and ALAD activity in five normal rabbits.

2,000 を越す 2 例を除き 1,336~715 で, 上部試料は下部試料の活性値に比べて平均値で 2.6 倍高かった。一方, 全血の ALAD 活性は 3,243~1,169 に及び, 多くは下部試料の活性値に近い値を示した。

Fig. 3 には, 5 例について上部試料より下部試料に至る各分画の ALAD 活性を示した。この結果, 上部試料より第 2・第 3 分画までの活性低下と, 下部試料に近い分画の低下量は大きかった。

3. 鉛の投与と ALAD 活性の変化

酢酸鉛の 30 μ g Pb/kg・体重 (1 群 3 羽), 50 μ g Pb/kg・体重 (1 群 3 羽) を耳静脈より投与し経時的に ALAD 活性の変動を追跡した。その結果の一部を Fig. 4-a, 4-b に示した。鉛投与後の ALAD 活性は各例とも同傾向の変動を示し, 5 日目にはほとんど投与前値まで回復した。とくに, 上部試料では投与前値を上回る例もみられた。

Table 3 に, 鉛投与前と投与後 5 時間目の ALAD 活性の変動量, 変動率を上部試料, 下部試料ならびに全血について比較した。

30 μ g/kg 投与群の ALAD 活性の減少率は 3 者ともに 55~66.2% であった。また, 50 μ g/kg 投与群では 80.2~90% であった。しかし ALAD 活性の変動量は,

Table 3. Comparison of the rate of decrease and levels of variation of ALAD activity among different specimens after administration of lead.

	YRC	ORC	WB	YRC	ORC	WB	YRC	ORC	WB
Administration of lead: 50 $\mu\text{g/kg}$									
Before	2500	713	1500	2387	1176	1820	2640	1282	1644
After 5 hours	365	71	192	444	200	325	523	233	300
Levels of variation	2135	642	1308	1943	976	1495	2117	1049	1344
Rate of decrease (%)	85.4	90.0	87.2	81.4	83.0	82.2	80.2	81.2	82.3
Administration of lead: 30 $\mu\text{g/kg}$									
Before	2922	938	1675	3220	1171	1957	2429	875	1314
After 5 hours	1238	363	610	1352	400	562	1069	394	538
Levels of variation	1684	575	1065	1868	771	1395	1360	481	776
Rate of decrease (%)	56.6	61.3	63.3	58.0	65.8	66.2	56.0	55.0	59.1

ALAD activity: 10^{-3} $\mu\text{moles PBG/ml RBC/hr}$. YRC: young red cells, ORC: old red cells, WB: whole blood Fig. 4-a. Changes in ALAD activity of young and old red cells and the whole blood after administration of lead (30 $\mu\text{g/kg}$ of body weight).

○: young red cells, ●: old red cells, ⊙: whole blood

30 $\mu\text{g/kg}$ 投与群で上部試料が 1,360 から 1,868 であったのに対し, 下部試料は 481 から 771 であった. また, 50 $\mu\text{g/kg}$ 投与群では, 上部試料が 1,943 から 2,135 であったのに対し, 下部試料は 624 から 1,049 であった. 活性値にして, 上部試料は下部試料にくらべ 2~3.3 倍減少量が大きかった.

IV. 考 察

個体の加齢と ALAD 活性とに関する研究で, ラットでは生後 9 週齢まで ALAD 活性は低下を続け, 以後一定レベルを維持することが報告されている^{13~15)}. しかし, ヒトでは個体の加齢と ALAD 活性について否定的

Fig. 4-b. Changes in ALAD activity of young and old red cells and the whole blood after administration of lead (50 $\mu\text{g/kg}$ of body weight).

○: young red cells, ●: old red cells, ⊙: whole blood

な結果が得られている^{4,12~14)}.

一方, 個体の加齢とは別に, 末梢血の加齢と ALAD 活性とに関する研究報告はみられない.

赤血球の加齢については Danon と Marikovsky⁹⁾ が比重液を用いた遠心操作により, 赤血球の比重に差があることを認め, 投与した ^{59}Fe が経時的に低比重血球から高比重血球に移行することから, 低比重血球は若く高比重血球は老化赤血球であると報告している. また, Borun ら¹⁶⁾は ^{59}Fe の摂取実験で, 遠心沈殿した赤血球を 4 分割し遠心上部 1/4 と下部 1/4 を比較したところ, ^{59}Fe の分布は前者に多く後者にきわめて少ないという結果を得て, 遠心上部は若い赤血球であり, 遠心下部は

古い赤血球であると報告し、他方 Marks と Johnson¹⁷⁾ は赤血球抵抗試験で、低張液に抵抗の強い赤血球中に⁵⁹Fe の存在が多いことから、若い赤血球は低張液に抵抗が強い細胞であると述べている。

本実験でも、比重液による遠心分別で1.086前後の低比重液上部の赤血球中に網赤血球が多かったこと、また、遠心上部試料はほとんどが網赤血球であったが下部試料には認められなかった。さらに、赤血球抵抗試験でも上部試料は下部試料にくらべ抵抗性が大きかったことから、上部試料は若い赤血球、下部試料は老化赤血球としたことに誤りはないであろう。

Fig. 3 に示したように、遠心操作によって得た各分画の ALAD 活性は下層になるにつれて低下していた。血球の加齢とともに ALAD 活性は低下してゆくことを示唆している。なお、赤血球の加齢とともに他の酵素活性も低下してゆくことが報告されている¹⁸⁻²⁰⁾。

全血を用いて測定した ALAD 活性値は、著者らの分画法で求めた値からみると下層の分画に近い値を示した。これは比重間隔 0.004 で調整した比重液を用いて求めた血球比重分布は一樣でなく、高比重血球の占める割合が多く、このため全血の ALAD 活性値は高比重の下部試料の ALAD 活性値に近くなったものと考えられる。Bishop と Prentice²¹⁾ が示したウサギの血液比重分布も同様な傾向であった。ヒトについて行なった Yaari²²⁾ の結果では、低比重の方が多い傾向も示されている。

鉛投与後の ALAD 活性値が減少率は上部試料も下部試料も、ほぼ同じであり回復経過も同様であった。鉛投与による活性低下と回復の変動量は若い赤血球に多く、下部試料の変動量の 2~3.3 倍にも達した。この観察は、鉛の初期暴露時に、ALAD 活性の低下は鉛作業者に比べて大きいという Hernberg ら²³⁾ や著者ら^{1,2)} の報告の解釈に有意義であった。職業的鉛作業者と異なり初期暴露者では ALAD 活性低下に若い赤血球集団の酵素活性の減少量が全血の活性値に大きく影響を与えているといえよう。鉛作業者のように、微量であっても連日あるいは反復暴露を受けている場合、低下した ALAD 活性が回復しえないうちに次の暴露に接するため、ALAD 活性は低値を持続するのであろう。

以上の結果は、Pb-B と ALAD 活性の相関は直線性を示さないが、活性値を対数表示した場合、両者間により直線性が得られる現象は、とくに、Pb-B が低値のとき、変動量の大きい若い赤血球の動きが大きく表現されることを示唆しているのであろう。

鉛中毒患者の骨髓赤芽球の ALAD 活性 (0.1~1.10

mμmoles PBG/10⁶ E/h) は健康者のレベル (1.80~3.04) より著しく低かったという知見を Wada ら²⁴⁾ は報告している。中毒患者のように生体の鉛収支以上の摂取が続いたとき、とくに生長期に骨髓系を中心とした造血組織への沈着があった場合^{25,26)}、鉛の半減期は無視できない。硬組織と軟組織からの半減期²⁷⁾を考えるならば、半減期の長い硬組織から血流中への鉛の遊離は長期にわたるから、ALAD 活性は造血系の段階から鉛による阻害を受けているであろうと考えられる。

Fig. 4 に示したように、鉛投与 5 日目の ALAD 活性が投与前より高値であった例が、実験例の 42% にみられた。このことは、鉛投与前より投与後 24 時間目まで連続 3 回の採血量が、約 30 ml になり、これが実験的瀉血に相当したものと推察される。実験操作上 buffy coat の除去時に網赤血球の一部除去はまぬがれえないとしても、5 日目の上部試料中には 70~95% の網赤血球が算定された。これは瀉血後 5 日前後にエリスロポエチンの産生が活発になり、新生赤血球が増加するという時期と一致しており^{28,29)}、若い赤血球が増加し網赤血球の陽性率が高かったものと推察された。このようなことから、上部試料中の ALAD 活性は血球分化過程で赤芽球のもつ ALAD 活性に近い値といえよう。

V. む す び

赤血球の比重差を利用し、遠心分別法を用いてウサギ赤血球を上部試料と下部試料に分け、これらの試料について網赤血球の算定と赤血球抵抗試験を行なった。

その結果、上部試料中には網赤血球が著明に多かった (30~95%) が、下部試料中にはみられなかった。また、上部試料中の赤血球は下部試料中の赤血球に比し、低張液による溶血に抵抗性を示した。このことから、上部試料の赤血球は若く、下部試料の赤血球は老化していることを証した。

老若赤血球の ALAD 活性を比較して、若い赤血球の ALAD 活性は老赤血球のそれに比べて、平均 2.6 倍高かった。

一方、鉛投与後の ALAD 活性の減少率は両者とも同様な傾向を示したが、減少の絶対量は若い赤血球に多く、その値は老赤血球の 2~3 倍に達した。

稿を終えるにあたり、赤血球の形態、性状等の検索をご指導いただいた昭和大学医学部臨床病理学教室細谷純一郎医局長、同中央研究検査室佐野欣一主任技師に深く感謝の意を表します。

本論文の一部は第 51 回日本産業衛生学会において発表した。

文 献

- 1) 平嶋侃一, 白井四郎, 石川清文, 平野英男, 花沢清磨: 鉛作業者の健康管理指針としての ALAD の評価 (II), 産業医学, 17: 453, 1975.
- 2) 平嶋侃一, 白井四郎, 吉尾周子, 石川清文, 花沢清磨, 平野英男: 鉛作業者の健康管理指針としての ALAD の評価 (IV), 産業医学, 19: 405, 1977.
- 3) 花沢清磨, 平野英男, 梅田満津子, 木内夏生, 石川清文: 間歇的小量鉛投与による生体反応の実験的研究, 産業医学, 18: 244—245, 1976.
- 4) 平野英男, 桜井信男, 平嶋侃一: 女子従業員の血中鉛量と ALAD 活性に関する一考察——鉛取扱作業者と比較して——, 日衛誌, 32: 384—390, 1977.
- 5) Schalm, O. W., Jain, C. N. and Carroll, E. J.: Veterinary Hematology, 3rd Ed., 388—391, Lea & Febiger, Philadelphia, 1975.
- 6) 板谷京子, 三谷一憲, 星野道雄, 近藤正人: Bonsignore らによる ALA-D 活性測定法の簡便化, 産業医学, 16: 276—277, 1974.
- 7) Chiba, M., Tashiro, A. and Kikuchi, M.: PH and the activity of porphobilinogen synthase in human blood, Clin. Chem., 23: 1602—1608, 1977.
- 8) Tomokuni, K.: δ -Aminolevulinic acid dehydratase test for lead exposure, Arch. Environ. Health, 29: 274—281, 1974.
- 9) Danon, D. and Marikovsky, Y.: Determination of density distribution of red cell population, J. Lab. & Clin. Med., 64: 668—674, 1964.
- 10) Miale, J. B.: Laboratory Medicine, Hematology, 1204, C. V. Mosby, St. Louis, 1972.
- 11) 山本きよみ, 三輪史朗, 米原ヤス子: 赤血球抵抗試験, 臨床検査, 22: 125—133, 1978.
- 12) Weissberg, J. B., Lioschitz, F. and Oski, F. A.: δ -Aminolevulinic acid dehydratase activity in circulating blood cells. A sensitive laboratory test for the detection of childhood lead poisoning, N. Eng. J. Med., 284: 565—569, 1971.
- 13) 丸田英夫: 鉛中毒に対する生体の感受性に関する研究 (第1報) ラットおよびヒト末梢血球中 δ -aminolevulinic acid dehydratase 活性について, 産業医学, 19: 67—74, 1977.
- 14) 千葉百子, 菊池正一: 加齢と血中 δ -アミノレブリン酸脱水酵素活性, 産業医学, 18: 391—394, 1976.
- 15) Davis, J. R. and Avram, M. J.: Developmental changes in delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD) activity and blood reticulocyte percent in the developing rat. A brief note, Mechanisms of Aging and Development, 7: 123—129, 1978.
- 16) Borun, E. R., Figueroa, W. G. and Perry, S. M.: The distribution of ^{59}Fe tagged human erythrocytes in centrifuged specimens as a function of cell age, J. Clin. Inv., 36: 676—679, 1957.
- 17) Marks, P. A. and Johnson, A. B.: Relationship between the age of human erythrocytes and their osmotic resistance: A basis for separating young and old erythrocytes, J. Clin. Inv., 37: 1542—1548, 1958.
- 18) Gastel, V. C. and Bishop, C.: Changes in activity of some enzymes during *in vivo* aging of mouse erythrocytes, Proc. Soc. Exptl. Biol. Med., 127: 1067—1071, 1968.
- 19) Thorup, O. A., Carpenter Jr. J. T. and Howard, P.: Human erythrocyte catalase: Demonstration of heterogeneity and relationship to erythrocyte aging *in vivo*, Brit. J. Haemat., 10: 542—550, 1964.
- 20) Komazawa, M. and Oski, F. A.: Biochemical characteristics of young and old erythrocytes of newborn infant, J. Pediatrics, 89: 102—106, 1975.
- 21) Bishop, C. and Prentice, C. T.: Separation of rabbit red cell by density in a bovine serum albumin gradient and correlation of red cell density with cell age after *in vivo* labeling with ^{59}Fe , J. Cell Physiol., 67: 197—208, 1965.
- 22) Yaari, A.: Mobility of human red cell of different age group in an electric field, Blood, 33: 159—163, 1969.
- 23) Hernberg, S., Tola, S., Nikkanen, J. and Valkonen, S.: Erythrocyte δ -aminolevulinic acid dehydratase in new lead exposure, A longitudinal study, Arch. Environ. Health, 25: 109—113, 1972.
- 24) Wada, O., Yano, Y., Toyokawa, K., Suzuki, T., Suzuki, S. and Katsunuma, H.: Human responses to lead: In special references to porphyrin metabolism in bone marrow erythroid cells, and clinical and laboratory study, Ind. Health, 10: 84—92, 1972.
- 25) Haumont, S. et Vincent, J.: Action du versenate de calcium sur le plomb fixe *in vivo* dans les compact, Experimental cell research, 18: 404—406, 1959.
- 26) Voigt, E. G. and Larsson, E. L.: Distribution of lead and mercury in femur of acutely poisoned rats, Acta Path., 47: 256—258, 1959.
- 27) 杉田 稔, 土屋健三郎, 岩尾総一郎: 重金属の生物学的半減期——最も遅い第3コンポーネントの存在——日衛誌, 33: 172, 1978.
- 28) 平嶋邦猛, 高久史磨: 造血機能の加齢による変化について——その実験的考察——, 老年病, 6: 407—412, 1962.
- 29) Reissman, R. K. and Ito, K.: Selective eradication of erythropoiesis by actinomycin D as the result of interference with hormonally controlled effector pathway of cell differentiation, Blood, 28: 201—212, 1966.

著者への通信先: 平野英男, 〒280 千葉市亥鼻町1丁目 千葉大学医学部衛生学教室 Reprint requests to Department of Hygiene, School of Medicine, Chiba University, Inohanacho 1-chome, Chiba, 280 Japan (H. Hirano)