短 報

赤血球 pyrimidine 5'-nucleotidase および δ -aminolevulinate dehydratase の活性に及ぼす重金属の試験管内での影響

In vitro Effect of Heavy Metals on the Activity of Pyrimidine 5'-Nucleotidase and δ -Aminolevulinate Dehydratase in the Human Erythrocyte

1974 年, 遺伝的に溶血性貧血を呈し, 好塩基性斑点の見られる患者の赤血球には, ピリミジンヌクレオチドである UMP および CMP の脱リン酸化反応に関与する酵素, pyrimidine 5'-nucleotidase (Py5N) の欠損が見られ, その結果, UMP, CMP が貯溜することが Valentine ら¹⁾ によって初めて明らかにされてより, 赤血球のヌクレオチド代謝と溶血との関連性が注目されはじめた。

一方, 鉛中毒時に好塩基性斑点の見られることが古くより知られていることから, 最近では *in vivo* における鉛と赤血球 Py5N 活性との関係に興味を持たれている。今回著者らは, 各種重金属の *in vitro* 添加実験により, 赤血球 Py5N がいかなる影響を受けるかを明きらかにするとともに, 従来より重金属に対して鋭敏とされてきた赤血球 δ -aminolevulinate dehydratase (ALA-D) に対するその影響と対比させながら検討したので報告する。

実験方法

①血液試料: 過剰の重金属に暴露されてない健康人の末梢血を集め, これを遠心して血球を分離し, 約 2 倍量の氷冷生食水で 2 回洗浄したものをサンプルとした。②酵素反応液への重金属添加: Table 1 に示す 7 種の化合物より一定濃度の重金属水溶液を作成し, この一定量を添加した時, 酵素反応液中の濃度が 10^{-5} および 10^{-4} mol/l となるようにした。なお, 2 価の Sn は溶液にすると酸化されやすいので使用直前に調製した。③赤血球 Py5N 活性の測定: 酵素アッセイは Paglia と Valentine²⁾ の方法に準じて実施した。洗浄後の赤血球を約 3 倍量の蒸留水で溶血し, 4°C で 20 時間透析する。あらかじめ, 透析後の溶血液中のヘモグロビン (Hb) 値を測定しておく。次に, 1 検体につき 2 本の試験管 (サンプル側とブランク側) を用意し, サンプル側には, 透析溶血液 0.5 ml, トリス緩衝液 (50 mmol/l, pH

Table 1. Metals and its compounds used in the experiment.

Metal	Its compound
Zn	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O
Hg	HgCl ₂
Cd	CdCl ₂
Sn	SnCl ₂ ·2H ₂ O
Ag	AgNO ₃
Cu	CuSO ₄ ·5H ₂ O
Pb	Pb(NO ₃) ₂

8.0) 0.9 ml, MgCl₂ (0.1 mol/l) 0.15 ml, CMP (20 mmol/l) 0.2 ml および重金属液 0.25 ml を加える。一方, ブランク側は, CMP だけを除き, それと同量の蒸留水を加える。両試験管を 37°C の恒温水槽中に静置し, 2 時間 incubate する。トリクロロ酢酸 (20%) 1 ml を加えて反応を止めたのち, 遠心して上清を分離する。この上清 1.5 ml を用いて, その中に含まれる無機リン (Pi) の量を高橋法³⁾ により定量する。赤血球 Py5N 活性は, Hb 1 g 当たり 1 時間に生成した Pi の μ mol として表わす。④赤血球 ALA-D 活性の測定: 洗浄後の赤血球を 11 倍量の蒸留水で溶血させ, この 1.2 ml を試験管にとり, 重金属溶液 0.3 ml, リン酸緩衝液 (0.2 mol/l, pH 6.8) 0.5 ml, および ALA 溶液 (20 mmol/l) 0.5 ml を加え, 37°C で 1 時間 incubate する。トリクロロ酢酸 (10%) 1 ml を加えて反応を止めたのち, Nikkanen ら⁴⁾ の方法に従って測定する。なお, 本実験成績では, 両酵素の活性とも, コントロールの活性を 100% とした時の相対値で表示した。

結果と考察

Fig. 1~2 に示すごとく, 10^{-5} ~ 10^{-4} mol/l の重金属添加により, 赤血球酵素 Py5N, ALA-D の活性はかなりの影響を受ける。一方, 両酵素に対する影響は, 同一金属においても相当異なる。たとえば, Zn を添加すると, ALA-D 活性は中程度に活性化されるが, Py5N 活性はほとんど影響を受けないか, むしろ若干の阻害が見られる。また Sn 添加では, いずれの濃度でも ALA-D は高度の活性阻害を受けるが, Py5N 活性は軽度の阻害しか受けず, 両者の間には顕著な差が見られる。このような傾向は, 10^{-5} mol/l の濃度で添加した Ag, Cu, Pb においても見られた。一方, Cd 添加では, 両酵素に対する阻害度はほぼ同程度であった。

赤血球酵素 Py5N の活性は, 重金属に対して鋭敏であり, 10^{-4} mol/l の添加濃度では顕著な影響を受ける。とくに本酵素の活性は, Hg によって最も強く阻害され,

Fig. 1. Effect of various metals on the activity of erythrocyte Py5N and ALA-D. The concentration of the metal added to the enzyme assay is 10^{-5} mol/l.

Fig. 2. Effect of various metals on the activity of erythrocyte Py5N and ALA-D. The concentration of the metal added to the enzyme assay is 10^{-4} mol/l.

更に Cd, Cu, Ag および Pb によっても強い阻害を受けることが明らかにされた。しかし, ALA-D を強く阻害する2価の Sn では, 軽度の阻害しか見られなかった。一方, 赤血球 ALA-D と Py5N との間で重金属に対する影響の程度を比較すると, 概して前者のほうがより強い活性阻害を受けることが明らかにされた。また, ALA-D に対する活性阻害は Pb で最も顕著であった。

さて, 最近 Angle と McIntire⁵⁾ は, 鉛に暴露された小児およびラットにおいて, 赤血球 Py5N 活性と血中鉛量との間には負の相関関係が見られることを報告した。同様の成績は, Buc と Kaplan⁶⁾, および佐藤ら⁷⁾ によ

っても報告された。これらの報告は, 赤血球 Py5N 活性が, 鉛暴露の指標として, また鉛中毒の早期検出法として有用であることを示唆するものと思われる。しかし, 一方では, 鉛投与家兎において, 赤血球 Py5N 活性と血中鉛量との間には有意な相関が見られなかったという報告⁸⁾ もあり, *in vivo* における両者の関係については更に追試が必要と思われる。

本論文の要旨は第 23 回中国四国合同産業衛生学会 (昭和54年10月, 高知市) において発表した。

文 献

- 1) Valentine, W.N., Fink, K., Paglia, D.E., Harris, S.R. and Adams, W.S.: Hereditary hemolytic anemia with human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency, *J. Clin. Invest.*, 54: 866—879, 1974.
- 2) Paglia, D.E. and Valentine, W.N.: Characteristics of a pyrimidinespecific 5'-nucleotidase in human erythrocytes, *J. Biol. Chem.*, 250: 7973—7979, 1975.
- 3) 高橋泰常: 組織中無機リン真値と creatine リン酸の定量法, 及び豚精子の phosphoamidase, creatine phosphokinase 作用について, *生化学*, 26: 690—698, 1955.
- 4) Nikkanen, J., Hernberg, S. and Tola, S.: Modifications of the δ -aminolevulinic acid dehydratase test and their significance for assessing different intensities of lead exposure, *Work Environ. Health*, 9: 46—52, 1972.
- 5) Angle, C.R. and McIntire, M.S.: Low level lead and inhibition of erythrocyte pyrimidine nucleotidase, *Environ. Res.*, 17: 296—302, 1978.
- 6) Buc, H.A. and Kaplan, J.C.: Red-cell pyrimidine 5'-nucleotidase and lead poisoning, *Clin. Chim. Acta*, 87: 49—55, 1978.
- 7) 佐藤雄一郎, 佐々木胤則, 安田秀子, 谷口直之, 斉藤和男: 鉛汚染指標としての赤血球酵素 pyrimidine 5'-nucleotidase 活性について, *日衛誌*, 34: 139, 1979.
- 8) Fujii, H.: A role of red cell pyrimidine 5'-nucleotidase in experimental lead poisoning, *Arch. Toxicol.*, 43: 59—64, 1979.

友国勝磨, 緒方正名

岡山大学医学部公衆衛生学教室

Katsumaro TOMOKUNI and Masana OGATA

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama, 700 Japan

昭和55年1月28日受付

通信先: 友国あて, Reprint requests to K. Tomokuni