原著

赤血球膜蛋白質に対する鉛の影響

福本 紘一*, 唐井 一郎**, 堀口 俊一**

EFFECTS OF LEAD ON THE PROTEIN OF ERYTHROCYTE MEMBRANES

Koichi FUKUMOTO,* Ichiro KARAI** and Shun'ichi HORIGUCHI**

In order to study the effects of lead in the circulating peripheral blood on the erythrocyte membrane, sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of protein in the erythrocyte membrane was performed in 28 men exposed to lead in a scrap lead refining factory and 18 men working in railway construction as the controls. Furthermore, in order to corroborate the effects *in vitro* experiments by SDS-PAGE of protein in the mixture of human erythrocyte membranes with added lead were performed.

1) In the lead workers compared with the controls, SDS-PAGE of protein in the erythrocyte membrane showed that relative concentrations of bands 1, 2, 3 and 4.1 were significantly decreased while those of bands 2.3, 6 and 7 were significantly increased.

2) SDS-PAGE of protein in the *in vitro* experiment showed that the relative concentrations of bands 1, 2, 3, 4.1 and 4.2 were decreased while those of bands 2.3, 4.5, 5, 6 and 7 were increased. Therefore, these results show the same trends as those of the *in vivo* experiments.

3) For the lead workers, the correlation coefficients between blood lead and bands 2, 2.3 and 3 were $r = -0.414$ ($p < 0.05$), $r = 0.545$ ($p < 0.01$) and $r = -0.509$ ($p < 0.01$), respectively. Also a higher coefficient of correlation ($r = -0.777$, $p < 0.001$) was found between bands 2 and 2.3.

4) As the molecular weight of substances showing bands 2 and 2.3 were 220700 and 133800, respectively, according to PAGE using molecular weight markers, band 2.3 is considered to be due to a cleavage product from that of band 2.

From these results, we summarized as follows. Lead combined with erythrocyte membrane decreases the band 3 penetrating lipid bilayer, and that causes the decrease of membrane transportation. On the other hand, the variation of band 2 and 4.1 influences the spectrin-actin network. This is considered to be one of the reasons that MCV is decreased.

I. 緒言

鉛暴露による貧血の機序には2通りが考えられる。一つは骨髄造血系におけるポルフィリン・ヘム合成系の阻害であり、ポルフィリン代謝、およびその代謝産物等について多くの研究がなされて、かなり解明が進んでいる^{1,2)}。他の一つは溶血性貧血であり、血流中の鉛が赤

血球に結合し、赤血球膜に変化をひき起こすことによるとされている^{3,4)}。ところで、赤血球膜は蛋白質52%、脂質41%、および糖質7%から構成されており⁵⁾、鉛が2価の重金属イオンであることから蛋白質への影響が大きいものと思われる。事実、Selhiら⁶⁾は*in vitro*の実験によって、赤血球膜に結合した鉛が膜蛋白質の配列に変化をきたし、酵素阻害が起こると報告している。また、著者らは鉛暴露による赤血球浸透圧脆弱性の低下^{7,8)}、機械的脆弱性の亢進⁹⁾、赤血球内イオンの変動と平均赤血球容積の減少¹⁰⁾、および、赤血球水分量の減少¹¹⁾等について報告してきた。これらの変化にはいずれも赤血球膜蛋白質の関与が考えられる。しかし、鉛暴露による赤血球膜蛋白質の変動については、まだ十分解明されていない。そこで、今回、著者らは鉛暴露労働者におけ

* 大阪府職業病センター

** 大阪市立大学医学部衛生学公衆衛生学教室
昭和57年2月3日受付

* Osaka Prefectural Institute of Occupational Health

** Department of Preventive Medicine and Public Health, Osaka City University Medical School
Received for publication, February 3, 1982

る赤血球膜蛋白質を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide disc gel 電気泳動法 (SDS-PAGE) によって分画し、その変動を観察した。また、ヒト赤血球膜に鉛を添加して SDS-PAGE を行い、同様に、赤血球膜蛋白質を分画する *in vitro* の実験も合せて行った。

II. 実験

1. 実験対象

鉛群として、故鉛精錬、およびハンダ製造工場で働く鉛暴露労働者男子 28 名、年齢平均 46.8 歳 (30~70 歳)、勤続年数 24.0 年 (0.6~31 年)、対照群として、高速鉄道の男子土木作業員 18 名、年齢平均 46.0 歳 (28~65 歳) を選んだ。なお、問診、および臨床医学的検査によって肝機能、および内分泌系に異常の認められた者は対象から除外した。

2. 鉛暴露の生体影響指標

血中鉛、尿中鉛はジチゾン・ポーラログラフ法¹²⁾、尿中 δ -アミノレブリン酸は友国法¹³⁾、赤血球数はコールターカウンター (コールター・エレクトロニクス社)、そして、ヘマトクリット値は毛細管法で測定した。

3. 赤血球膜の調整

膜試料の調整および保存は 4°C 以下で行い、Dodge ら¹⁴⁾の方法に準じて調整した。すなわち、ヘパリン採血した血液を生理的食塩水で 3 回洗浄し、buffy coat を除去し、遠心沈殿した洗浄血液の約 10 倍量の脱イオン水を加え、はげしく振盪して溶血させた。さらに、完全に溶血させるために 20 分間放置後、30,000 g、15 分間遠心した。次に、pH 7.5 の 0.25 mM-トリス塩酸緩衝液で 3 回洗浄し、0.1 M-トリスグリシルグリシン緩衝液 (pH 8.2) でヘモグロビンを除去した。その後、3 回 2.5 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.5) で洗浄した後、30,000 g、20 分間、冷却遠心して白色の赤血球膜を得た。

4. 赤血球膜蛋白質の分画

Fairbanks ら¹⁵⁾の方法に準じた。

1) SDS gel の調整

I 液: NaH_2PO_4 2.4 g, SDS 2.0 g, N, N, N', N'-テトラメチレンジアミン 0.2 ml を溶解後、pH 7.2 に調整して脱イオン水で全量を 50 ml とした。

II 液: アクリルアミド 10 g, N, N-メチレンビスアクリルアミド 0.35 g を脱イオン水で全量を 50 ml とした。

III 液: 過硫酸アンモニウム 30 mg を脱イオン水で 50 ml とした。

I 液 3.0 ml, II 液 3.0 ml, III 液 1.0 ml, 脱イオン水

5 ml を混合し、内径 5 mm×長さ 7 mm のガラス管に注入した。上層に水約 100 μl を重層後、一昼夜室温で放置して重合させた。

2) 試料の溶解

SDS 1 g, メルカプトエタノール 1 ml, マラカイトグリーン 1 mg, 尿素 24.0 g, 第一リン酸ナトリウム 0.12 g を溶解後、pH 7.2 に調整し、全量を脱イオン水で 50 ml とした。この溶液の 0.1 ml を赤血球膜 0.1 ml に加え、45°C 60 分間加温した。淡緑色透明になった溶液の 30 μl ずつをゲル管に重層した。なお、試薬の大半は和光純薬製の特級を使用した。

3) 通電条件

試料を重層したゲル管を泳動層にセットし、電解液 ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 15.6 g, SDS 1 g を 2N-NaOH で pH 7.2 に調整後、全量を脱イオン水で 100 ml としたもの) を満たした。ゲル管 1 本につき 6 mA の定電流で泳動した。マラカイトグリーンがゲルの先端に達するまで通電した。通電に約 160 分を要した。

4) 膜蛋白質の検出

蛋白質の染色には、0.01% クーマシーブリリアントブルー R 250, 50% メタノール, 10% 酢酸の割合になるように混合した染色液を用いた。染色時間は 10 時間、脱色には 5% 酢酸を用いて、分画が鮮明になるまで 5% 酢酸を入れ換えた。

染色をしたディスクは血清蛋白泳動用デンストメータ (常光産業製) を一部改良して 570 nm で測定した。

5. 分子量測定

蛋白標準液 (Boehringer Mannheim の Combitheic®) を赤血球膜と同様の処理を行って泳動、染色した。

6. *in vitro* の実験

ヒト赤血球膜 1 ml 蛋白質量 220 mg/dl に酢酸鉛 [$\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$] を用いて、鉛濃度が 0.01 $\mu\text{molPb}/\text{ml}$ および 0.1 $\mu\text{molPb}/\text{ml}$ になるように加えた。密栓して、37°C、2 時間ゆっくり攪拌しながら加温した後、*in vitro* の実験と同様に操作し、膜蛋白質の分画を行った。

7. 赤血球膜蛋白質の定量

Lowry ら¹⁶⁾の方法に準じた。赤血球膜 20 μl を 10% SDS で可溶化した後、アルカリ銅試薬を加え、室温に 10 分間放置した。つぎに、Folin-Ciocalteu 試薬を加え、30 分後に 750 nm で比色した。

III. 実験結果

1. 鉛暴露の生体影響指標の変化

Table 1 に示すように、鉛群では対照群と比較し、血中鉛 6.9 倍、尿 δ -アミノレブリン酸 3.2 倍といずれも

Table 1. Lead exposure levels for lead workers and controls.

	Lead workers (<i>n</i> = 28)		Controls (<i>n</i> = 18)	
	GM	DF	GM	DF
Blood lead ($\mu\text{g}/100\text{ g}$)	35.97	1.40***	5.23	1.21
Urine lead ($\mu\text{g}/\text{l}$)	103.36	2.39***	12.41	1.75
Urine δ -ALA (mg/l)	7.13	0.0331***	2.25	0.0136

GM, Geometric mean; DF, dispersion factor; ALA, aminolevulinic acid. *** Significant difference from the controls at $p < 0.001$.

Fig.1. SDS-PAGE disc of the control and lead-exposed workers. Fractionation of erythrocyte membrane protein from the control (blood lead, $5.7\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$) and lead exposed workers (blood lead, $56.8\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$). Bands were numbered in increasing number from the cathode. M: marker.

有意に高値を示した。また、赤血球数は鉛群で 467 ± 31 万/ mm^3 , 対照群 481 ± 34 万/ mm^3 ($p < 0.05$), ヘマトクリット値は鉛群で $43.2 \pm 3.2\%$, 対照群 $46.1 \pm 3.2\%$ ($p < 0.01$) で両群に有意差を認めた。

2. 赤血球膜蛋白質分画

血中鉛 $56.8\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$ の鉛労働者, および $5.7\text{ }\mu\text{g}/100\text{ g}$ の対照者の赤血球膜 SDS-PAGE のディスクを Fig.1 に示す。鉛労働者 (下のディスク) では, 対照者と比較して, バンド1およびバンド2の低下がみられる。また, バンド2.3の上昇が認められる。Fig.2 はディスクをデンストメータにかけて得られたデンストグラムである。この場合, バンド1, バンド2, およびバンド3の低下が認められ, また, バンド2.3の上昇が認められる。

Table 2 は鉛群と対照群の分析結果を示す。鉛群と対照群との比較を容易にするため, 各バンドにおけるピーク高^{17,18)} の相対百分率の平均値をとり, 鉛群/対照群の比を算出した。比が1以上となったバンド, すなわち鉛

で上昇群したバンドは 2.3, 6, および7であった。また, 比が1以下となったものはバンド3およびバンド4.1 蛋白質であった。

3. *in vitro* の実験

Fig.3 に示すように鉛添加量の増加に伴い, バンド1, バンド2, およびバンド3の低下が認められた。また, バンド2.3蛋白質の上昇が認められたが, 鉛暴露労働者における実験よりもその程度は顕著でない。鉛添加実験を3回くり返し, その平均値を求め, コントロール値を1として鉛添加時との比を算出した。Table 3 に示すように, 鉛添加時の膜蛋白質の変動は, *in vivo* 実験の変動とほぼ同様の傾向を示した。

4. 血中鉛と赤血球膜蛋白質との関係

in vivo および *in vitro* 実験で同様な傾向をもって変動したバンドについて, 鉛暴露の最良の指標とされている血中鉛量との相関関係を検討したところ, Table 4 の結果を得た。血中鉛と有意の相関を認めたものはバンド2, バンド2.3およびバンド3蛋白質であった (Fig.4,

Table 2. Mean percentages of each band in electrophorograms of erythrocyte membranes and ratio of mean percentages in lead workers and controls for each band.

Band No.	Lead workers (<i>n</i> = 28) Mean ± S.D.	Controls (<i>n</i> = 18) Mean ± S.D.	Lead workers/ controls
1	10.23 ± 0.813	10.52 ± 0.817	0.972
2	11.84 ± 0.851	12.19 ± 0.944	0.971
2.1	6.93 ± 0.814	6.36 ± 0.792	1.005
2.2	4.89 ± 0.581	4.90 ± 0.599	0.998
2.3	6.54 ± 0.630***	5.87 ± 0.643	1.114
3	9.23 ± 0.610***	10.11 ± 0.636	0.913
4.1	9.73 ± 0.368*	10.00 ± 0.425	0.973
4.2	8.86 ± 0.371	8.93 ± 0.471	0.992
4.5	9.60 ± 0.550	9.46 ± 0.564	1.015
5	9.73 ± 0.479	9.68 ± 0.417	1.005
6	6.89 ± 0.510*	6.51 ± 0.515	1.058
7	6.03 ± 0.820*	5.46 ± 0.739	1.104

Significant differences : *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$.

Fig. 2. Electrophorogram of erythrocyte membrane protein from the controls and from lead exposed workers. M : marker, Hb : hemoglobin.

Fig. 5).

5. 赤血球膜蛋白質間の相互作用

血中鉛との間に有意の相関を認めたバンド2, バンド2.3 およびバンド3蛋白質について, バンド間の関係について検討した. Fig. 6 に示すようにバンド2とバンド

2.3 蛋白質との間に相関が認められた. すなわち, バンド2の低下に伴い, バンド2.3の上昇がみられる. そこで, この両者の関係をさらに検討するため, バンド2およびバンド2.3蛋白質を中心として前後の分子量測定を行って Table 5 に示す結果を得た. バンド1, バンド2の測定値は文献値^{19,20)}とよく一致した. バンド2.3蛋白質についての報告はみられないが, $133,800 \pm 3,100$ dalton という値を得た. また, バンド3およびバンド4.1 蛋白質の分子量は文献値²¹⁾とよく一致した.

IV. 考 察

最近の赤血球膜のモデルについては Singer と Nicolson^{22,23)} の流動モザイクモデルが一般に受け入れられている. それによると脂質2重層の中に大小異なる球状蛋白質が埋没したり, あるいは貫通している. この蛋白質には2種類あり, 一つは内在性蛋白質といわれ脂質2重層を貫通しており, バンド3蛋白質とグリコホリンがこれに相当する. このうちバンド3はイオンの透過性, 水の輸送, 糖の輸送など膜輸送を司る役目があるといわれている^{24~26)}. しかし, これが $\text{Na}^+/\text{K}^+\text{ATPase}$ であるという確証は現在まだ得られていない. 他の一つは表在性蛋白質といわれ, スペクトリンをはじめとする多くの蛋白質がこれに相当し, 細胞膜の内表面にあって膜の可変性の維持および膜構造保持の役目をもっていると考えられている^{27,28)}.

Table 3. Change of erythrocyte membrane by adding lead.

Band No.	Lead added				
	Control Peak height (mm)	0.01 $\mu\text{mol Pb/ml}$ Peak height (mm)	Ratio	0.1 $\mu\text{mol Pb/ml}$ Peak height (mm)	Ratio
1	8.8	8.3	0.943	8.0	0.909
2	12.8	12.5	0.977	11.1	0.867
2.3	5.8	6.2	1.069	6.8	1.172
3	17.1	16.0	0.936	13.1	0.766
4.1	12.5	12.0	0.960	10.6	0.848
4.2	13.4	13.5	1.007	11.9	0.888
4.5	9.8	10.0	1.020	10.9	1.112
5	10.1	10.7	1.059	14.0	1.386
6	5.3	5.5	1.038	7.5	1.415
7	4.3	4.3	1.000	6.1	1.419

Mean values of triplicate analysis

Fig. 3. Electrophoretogram of erythrocyte membranes with added lead, *in vitro* experiment. Ten μl of lead acetate was added to 1 ml of erythrocyte membranes (256 mg protein/dl), and the mixture was incubated at 37°C for 2 hours.

Table 4. Correlation coefficients between absorbance of each band and blood lead concentration in workers.

Band No.	<i>r</i>
1	-0.349
2	-0.414*
2.3	0.545**
3	-0.509**
4.1	-0.305
6	0.302
7	0.109

Significant differences: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$.

Fig. 4. Correlation between blood lead and band 2.3 of erythrocyte membrane protein in lead exposed group. $r=0.545$, $y=0.034x+5.12$, $n=28$, $p < 0.01$.

Fig. 5. Correlation between blood lead and band 3 of erythrocyte membrane protein in lead exposed group. $r = -0.509$, $y = 10.10 - 0.022x$, $n = 28$, $p < 0.01$.

Fig. 6. Correlation between band 2 and band 2.3 in lead exposed group. $r = -0.777$, $y = 13.43 - 0.59x$, $n = 28$, $p < 0.001$.

今回得た結果によれば、鉛群でバンド3およびバンド4.1蛋白質が有意に低下した (Table 2, Fig. 3). このうち、バンド3の低下は *in vitro* 実験においても同様に認められており、 $0.1 \mu\text{mol Pb/ml}$ でコントロール値と比較し、23.4%と膜蛋白分画中一番大きい変動を示した (Table 3). ところで、バンド3蛋白質の低下は、赤血球輸送能力を低下させ、著者らがすでに報告している赤血球内Kイオンの減少¹⁰⁾、赤血球水分量¹¹⁾の減少に関与しているものと考えられ、赤血球表面積/赤血球容積比の増大をもたらすものと思われる²⁹⁾. また、バンド3蛋白質は脂質二重層を貫通していることから、その低下は隣接する膜コレステロールや、膜リン脂質に影響を及ぼし、すでに報告している膜コレステロールの増加および膜ホスファチジルコリンの増加³⁰⁾、すなわち膜外表面脂質の増加に伴う脂質の非対称性配置の変動にも関与していることが考えられる. このことはまた赤血球の流動性の低下を招く一因になる可能性が考えられる^{31, 32)}.

Table 5. Correlation coefficients between the range of each band of electrophorogram in erythrocyte membrane of lead workers.

Band No.	2	2.3	3
2.3	-0.777***	—	
3	0.148	-0.380*	

* $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ ($n = 28$)

Table 6. Molecular weight of polypeptides in the erythrocyte membrane of lead workers.

Band No.	Mean	S.D.
1	241,500	4,900
2	220,700	3,600
2.3	133,800	3,100
3	93,400	2,000
4.1	78,000	1,600
		(dalton)

Values of mean in the table is the average of ten measurements.

一方、鉛群で上昇したバンドのうち、バンド2.3とバンド2蛋白質との相関は $r = -0.777$ ($p < 0.001$) で、両者の間に強い相互作用のあることがうかがわれた. そこで、さらに分子量測定を行ったところ、バンド2は220,700 daltonであり、バンド2.3蛋白質は133,800 daltonであったことから、バンド2.3はバンド2蛋白質の分解産物の可能性が考えられる. ところで、血中鉛の増加に伴うバンド2.3の上昇およびバンド3の低下は、量-影響関係が認められることから細胞レベルでの鉛暴露指標になりうるものと思われる (Fig. 4, 5).

次に、バンド1およびバンド2蛋白質は *in vivo* 実験および *in vitro* 実験において低下傾向がみられた. とりわけバンド2蛋白質は血中鉛との間に有意の相関が認められた (Table 4). バンド2はスペクトリンの light chain³³⁾であり、バンド1蛋白質とともにバンド4.1蛋白質の存在下にアクチンと spectrin actin network を形成し³⁴⁾、赤血球膜脂質二重層を内表面から保持しているといわれている³⁵⁾. 今回得られた結果ではバンド4.1蛋白質の低下も認められた. 一方、spectrin actin network が形成される過程においてCaイオンの存在を裏付ける多くの報告がある^{19, 36, 37)}. また、OngとLee³⁸⁾はCaとPbの相互作用から、膜蛋白質に結合する site はCaイオンおよびPbイオンとも同じ位置

にあり、分子量で130,000~230,000の間にあるとした。今回得られたバンド2蛋白質の分子量は220,700 daltonであり、この領域に一致するものである。したがって、バンド2蛋白質およびバンド4.1蛋白質の変動は鉛による赤血球の可変性の低下への関与が考えられる。ここで、バンド6およびバンド7蛋白質については膜における意義に不明な点もあり、かつ血中鉛との相関も今回は低かったことから検討から除外した。

以上のことから、赤血球膜に結合した鉛はバンド3蛋白質を低下させ、膜輸送能力の低下をきたす。また、バンド2蛋白質およびバンド4.1蛋白質の変動は spectrin actin network に影響を及ぼす。これらの変化が一因となって赤血球膜の流動性が低下し、赤血球表面積/赤血球容積比の増大傾向が生ずるものと推察される^{39,40)}。

V. 結 論

赤血球膜に対する鉛の影響を検討するため、鉛群として故鉛精錬、ハンダ製造工場で働く男子労働者28名、対照群として高速鉄道の土木作業員18名について赤血球蛋白質の分画を行った。また、*in vivo* での変化を確認するため、ヒト赤血球膜に鉛を添加して同様の操作を行って以下の結果を得た。

1) 鉛群では対照群と比較し、赤血球膜蛋白質のバンド3およびバンド4蛋白質の相対濃度が有意に低下した。また、バンド2.3, 6および7が上昇した。

2) *in vitro* の実験結果は、バンド1, 2, 3, 4.1および4.2が低下傾向を示した。また、バンド2.3, 4.5, 5, 6および7の相対濃度が上昇を示し、*in vivo* の実験とほぼ同様な傾向を示した。

3) 鉛群における血中鉛と赤血球膜蛋白質分画の各バンドとの関係をみると、バンド2と $r = -0.414$ ($p < 0.05$)、バンド2.3との間に $r = 0.545$ ($p < 0.01$)、また、バンド3との間に $r = -0.509$ ($p < 0.01$) で両者間に相関を認めた。

4) 赤血球膜蛋白質の相互作用については、バンド2とバンド2.3蛋白質の間に $r = -0.777$ ($p < 0.001$) と強い負の相関を認めた。さらに、分子量測定の結果バンド2蛋白質は220,700 daltonであり、また、バンド2.3蛋白質は133,800 daltonであった。これらのことからバンド2.3はバンド2蛋白質の分解産物の可能性が示唆された。

以上のことから、赤血球膜に結合した鉛はバンド3蛋白質を低下させ、膜輸送能力の低下を招く。また、バンド2蛋白質およびバンド4.1蛋白質の変動は spectrin actin network に影響を及ぼす。これらのことが一因と

なって赤血球膜流動性が低下し、赤血球表面積/赤血球容積比の増大傾向が生ずるものと推察される。

文 献

- 1) Waldron, H.A. and Stöfen, D.: Subclinical Lead Poisoning, Academic Press, New York, 1974.
- 2) 井村伸正, 中尾 真, 鈴木継美(編): 中毒学における生化学的アプローチ, 篠原出版, 東京, 1980.
- 3) Rubino, G.F. Prano, V. and Fiorina, L.: Folia Med. (Napoli), 39: 1117, 1956.
- 4) Clarkson, T.W. and Kench, J.E.: Uptake of lead by human erythrocytes *in vitro*, Biochem. J., 69: 432-434, 1958.
- 5) 高久史磨, 水上茂樹(編): 血液の病態生化学, 朝倉書店, 東京, 1979.
- 6) Selhi, H.S. and White, J.M.: The effect of lead on the red cell membrane, Postgrad. Med. J., 51: 765-769, 1975.
- 7) Horiguchi, S., Teramoto, K., Nakano, H., Shinagawa, K., Endo, G. and Kiyota, I.: Osmotic fragility test of red blood cells of lead workers by coil planet centrifuge, Osaka City Med. J., 20: 51-53, 1974.
- 8) Karai, I., Fukumoto, K. and Horiguchi, S.: Studies on osmotic fragility of red blood cells determined with a coil planet centrifuge for workers occupationally exposed to lead, Int. Arch. Occup. Environ. Health, 48: 273-281, 1981.
- 9) Karai, I., Fukumoto, K. and Horiguchi, S.: Effect of heavy metal ions on mechanical fragility of human blood cells, J. Toxicol. Sci., 5: 258-259, 1980.
- 10) Fukumoto, K., Karai, I. and Horiguchi, S.: The effects of heavy metal ions on membrane of red blood cell, J. Toxicol. Sci., 5: 258-259, 1980.
- 11) 唐井一郎, 福本紘一, 蔭山勝弘, 堀口俊一: 赤血球内水分量におよぼす鉛の影響, 産業医学, 23: 306-307, 1981.
- 12) Horiuchi, K., Horiguchi, S., Shinagawa, K., Takada, F. and Teramoto, K.: A polarographic method for the determination of a small amount of lead in biological materials, Osaka City Med. J., 14: 113-118, 1968.
- 13) Tomokuni, K. and Ogata, M.: Simple method for the determination of urinary-aminolevulinic acid as index of lead exposure, Clin. Chem., 18: 1534-1536, 1972.
- 14) Dodge, J.T., Michell, C. and Hanahan, D.J.: The preparation and chemical characteristic of hemoglobin-free ghost of human erythrocytes, Arch. Biochem. Biophys., 110: 119-130, 1963.
- 15) Fairbanks, G., Steck, T.L. and Wallach, D.F.H.: Electrophoretic analysis of the major polypeptide of human erythrocyte membrane, Biochemistry, 10: 2606-2617, 1971.
- 16) Lowry, O.H., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193: 265-275, 1951.
- 17) Burtis, C.A. and Gere, D.: Nucleic acid con-

- stituent by liquid chromatography, Varian Aerograph's Rev., 1970.
- 18) 舟阪 渡, 池川信夫: 最新ガスクロマトグラフィー〔I〕, 広川書店, 東京, 131-134, 1979.
 - 19) Palek, J. and Liu, S.C.: Dependence of spectrin organization in red blood cell membranes on cell metabolism: Implications for control of red cell shape, deformability and surface area, *Semin. Hematol.*, 16: 75-93, 1979.
 - 20) Palek, J., Liu, S.C. and Snyder, L.M.: Metabolic dependence of protein arrangement in human erythrocyte membranes. 1. Analysis of spectrin-rich complex in ATP* depleted red cell, *Blood*, 51: 385-395, 1978.
 - 21) Steck, T.L.: The organization of protein in human red blood cell membrane, *J. Cell Biol.*, 62: 1-19, 1974.
 - 22) Singer, S.J. and Nicolson, G.L.: The fluid mosaic model of the structure of cell membrane, *Science*, 175: 720-731, 1972.
 - 23) Nicolson, G.L.: Transmembrane control of the receptors on normal and tumor cells, 1. Cytoplasmic influence over cell surface components, *Biochim. Biophys. Acta*, 457: 57-108, 1976.
 - 24) Cabantchik, Z.I. and Rothstein, A.: Membrane proteins related to anion permeability of human red blood cells, *J. Membr. Biol.*, 15: 207-227, 1974.
 - 25) Brown, R.A., Feinstein, M.B. and Shaafi, R.I.: Membrane protein related to water transport in human erythrocytes, *Nature*, 254: 523-525, 1975.
 - 26) Tosteson, D.C., Ovchinnikov, Y.V. and Latorre, R.: Membrane transport processes, 2, Raven Press, New York, 1978.
 - 27) Choen, C.M. and Branton, D.: The role of spectrin in erythrocyte membrane stimulated actin polymerization, *Nature*, 279: 163-165, 1979.
 - 28) Marchesi, V.T.: Functional proteins of the human red blood cell membrane, *Semin. Hematol.*, 16: 3-20, 1979.
 - 29) 唐井一郎, 福本紘一, 片平卓男, 堀口俊一: 赤血球の機械的脆弱性に及ぼす各種金属の影響, *住友産業衛生*, 16: 41-45, 1980.
 - 30) Karai, I., Fukumoto, K. and Horiguchi, S.: Alterations of lipids of the erythrocyte membranes in workers exposed to lead, *Int. Arch. Occup. Environ. Health*, 50: 11-16, 1982.
 - 31) Cooper, R.A., Leslie, M.H., Fischkoff, S., Shitzky, M. and Shattil, S.J.: Factors influencing of the lipid composition and fluidity of red cell membranes *in vitro*: Production of red cells possessing more than two cholesterol per phospholipid, *Am. Chem. Soc.*, 17: 327-331, 1978.
 - 32) Cooper, R.A., Durocher, J.R. and Leslie, M.H.: Decreased fluidity of red cell membrane lipids in abetalipoproteinemia, *J. Clin. Invest.*, 60: 115-121, 1977.
 - 33) Kirkpatrick, F.H.: Spectrin: Current understanding of its physical biochemical and functional properties, *Life Sci.*, 19: 1-18, 1976.
 - 34) Ungewickell, E., Bennett, P., Calvert, R., Ohanian, V. and Gratzner, W.B.: *In vitro* formation of a complex between cytoskeletal proteins of the human erythrocyte, *Nature*, 280: 811-814, 1979.
 - 35) 野沢義則: 生体膜の流動性と機能, *生化学*, 2: 52-82, 1975.
 - 36) Cohen, C.M. and Solomon, A.K.: Ca binding to the human red cell membrane: Characterization of membrane preparations and binding sites, *J. Membr. Biol.*, 29: 345-372, 1976.
 - 37) Lorand, B.L., Siefiring, G.E. and Krentz, L.L.: Enzymatic basis of membrane stiffening in human erythrocytes, *Semin. Hematol.*, 16: 65-74, 1979.
 - 38) Ong, C.N. and Lee, W.R.: Interaction of calcium and lead in human erythrocytes, *Br. J. Ind. Med.*, 37: 70-77, 1980.
 - 39) Karai, I., Fukumoto, K. and Horiguchi, S.: Mechanism of increased osmotic resistance of red cells in workers exposed to lead, *Br. J. Ind. Med.*, 39: 153-156, 1982.
 - 40) Karai, I., Fukumoto, K. and Horiguchi, S.: Effects of lead *in vitro* on water metabolism and osmotic fragility of human erythrocytes, *Br. J. Ind. Med.*, 39: 295-299, 1982.

著者への通信先: 福本紘一, 〒540 大阪市東区京橋 3-15 大阪府職業病センター *Reprint requests to* Osaka Prefectural Institute of Occupational Health, 3-15, Kyobashi, Higashiku, Osaka, 540 Japan (K. Fukumoto)