

16 ホウ酸塩の代謝について (第5報)

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

北海道立衛生研究所
北海道大学薬学部

金 島 弘 恭 三 沢 隆 行
赤 木 満 洲 雄

緒 言

著者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, ラツテ)にホウ酸塩を経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 Glycerinaldehyde phosphate dehydrogenase³⁾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浸入の有無, および比較的に異なる糖代謝系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 方 法

1) 動物および飼養条件

動物は体重 0.5~0.95kg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方法などはすべて第1報¹⁾と同様に行つた。

2) 赤血球の分離精製

心臓穿刺により採血し(血液 1ml につきシユウ酸カリウム 2mg を添加), ただちに 4°C で赤血球を遠心分離 (3000R. 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。

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⁾によつた。

4) 嫌氣性解糖作用の測定

嫌氣性解糖の試験は Lepage の方法⁵⁾によつておこない, その際生成する乳酸を Barker-Summerson の方法⁶⁾によつて定量した。

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 分光光度計を用いて行つた。

実 験 結 果

1) 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 5ml に 0.02M ホウ酸溶液 0.1ml を加え, とどき攪拌しながら 30°C の水浴中に 1 時間保つ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。

Table I Distribution of Boron in Erythrocyte and Plasma after Addition of Borate to Guinea Pigs 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 |

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 60~125 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。また血漿中のそれと比較して 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

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 0.02 M または 0.04 M 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 0.2ml 加えてホウ素レベルを 108 μg/ml および 216 μg/ml とし, 30°C でとどき攪とうしながら 30 分間保つたのち血中のメトヘモグロビン量を測定し血液 0.2ml に

* 三炭糖磷酸脱水素酵素

Table II Boron Levels In Erythrocyte and Blood after Administration of Borate to Guined Pig

| weight (kg) | Sex | Boron admist (mg/kg) | Boron in erythrocyte | | Boron per cent in blood | |
|-------------|-----|----------------------|----------------------|----------------------|-------------------------|-----------------|
| | | | Control (μg/ml) | Boron admist (μg/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 |

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

| Weight (kg) | Sex | Amount of MeHb* (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 | ♀ | 0.35 | 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 | 0.35 | 5.0 | 22.1 |
| 0.50 | ♀ | 0.29 | 1.81 | 6.3 | 12.5 |

Average 2.5 ± 0.4

Final boron concentration; 108 μg/ml

* MeHb; methemoglobin

** Hb; hemoglobin

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 μg/ml のときは 1.3~6.3 倍, 216 μg/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。

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

| Weight (kg) | Sex | Amount of MeHb (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

Final boron concentration; 216 μg/ml

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。

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

| Weight (kg) | Sex | Boron admist (mg/kg) | Amount of MeHb (g/dl) | | Ratio of MeHb. form (B/C) | Amount of Hb (g/dl) |
|-------------|-----|----------------------|-----------------------|------------------|---------------------------|---------------------|
| | | | Control (C) | Boron admist (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 |

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 のホウ酸炭酸-水素カリ緩衝液 (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時間保つたのち、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 VII に示すとおりでグルコースの嫌氣的解糖作用は 0.01M ホウ酸塩によつて著明に阻害されその平均阻害率は 37.3 ± 4.3 (S.E) % であつた。

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

| weight (kg) | Sex | Amount of lactate Produced Perml. in react. mixt | | Inhibition rate (%) |
|----------------|-----|--|---------------------------|---------------------------|
| | | Control (μ g) | Boron* added(μ g) | |
| 0.70 | ♂ | | 34 | 26 |
| 0.65 | ♀ | | 60 | 42 |
| 0.90 | ♂ | | 60 | 40 |
| 0.80 | ♂ | | 72 | 44 |
| 0.80 | ♂ | | 56 | 30 |
| 0.70 | ♀ | | 54 | 26 |

Average : $37.3 \pm 4.3\%$

* 0.01M borate (final boron concentration : $108\mu\text{g/ml}$)

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い、 38°C に1時間保つたのち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 VII Inhibition of Anaerobic Glycolysis in Guinea Pig's Erythrocyte Administration of Borate

| Weight (kg) | Sex | Boron administ (mg/kg) | Boron in eryth- rocyte ($\mu\text{g/ml}$) | Amount of lactate produced per ml in react. mixt | | Inhibi- tion 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 : $20.7 \pm 3.5\%$

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、かかる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ぬ。

要 約

- 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, 三沢, 金島, 本誌, 13, 183 (1962).
- 2) 赤木, 三沢, 金島, 本誌, 14, 110 (1964).
- 3) 赤木, 三沢, 金島, 本誌, 投稿中.
- 4) 三沢, 金島, 本誌, 13, 214 (1962).
- 5) G. A. Lepage : J. Biol.Chem., 178, 1009 (1948).
- 6) S. B. Barker, W. H. Summerson ; *ibid.*, 138, 535, (1941).
- 7) Evelyn.K. A, H. T. Malloy ; *ibid.*, 126, 655(1938).

Studies on the Metabolism of Borate(Part 5)
 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)
 Masuo Akagi
 Faculty of Pharmaceutical Sciences, Hokkaido University)

For the purpose of studying the toxicity of borate on the blood, the effects on erythrocytes of guinea pigs were investigated. From the results observed 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 in accordance with the amounts 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.