

貧血に及ぼす鉛、蛋白質及びビタミンCの影響

鈴江 緑衣郎

Effects of Ascorbic Acid, Protein and Lead on the Anemic Guinea Pigs.

Ryokuero SUZUE

To clarify the effects of ascorbic acid, protein and lead on the anemia of guinea pigs, following experiments were carried out.

1) NADPH - Cytochrome C reductase is a limiting enzyme of drug metabolizing system in liver microsome. Activity of the enzyme was inhibited not by protein or ascorbic acid, but by lead.

2) δ Aminolevulinic acid synthetase was activated compensatively by lead administration, ascorbic acid deficiency and low protein diet intake.

3) δ - Aminolevulinic acid dehydratase activity was inhibited severely by the administration of lead and mildly by the deficiency of ascorbic acid.

From these findings, author concludes that the healing mechanism of protein in lead poisoned anemia is different from that of ascorbic acid. The simultaneous administration of high protein diet and ascorbic acid is very effective to the lead poisoned anemia.

総 括

女性に多い貧血は、鉛中毒によってもよく起こる。本論文では鉛中毒の場合の貧血に対して、蛋白質及びビタミンCの影響について調べてみた。薬物代謝酵素系となっている肝臓のミクロゾーム酵素群中の律速酵素であるNADP-Cytoschrome C reductase活性は鉛により活性はやや低下していたが蛋白質量やビタミンCでは余り強い影響を受けていなかった。ヘム合成酵素系については δ アミノレブリン酸合成酵素は鉛投与、アスコルビン酸欠乏、低蛋白質投与などにより代償的に活性が増加していた。

一方 δ アミノレブリン酸脱水酵素活性は鉛投与により強く押さえられ、アスコルビン酸欠乏により中程度に押さえられた。このことより鉛中毒時の貧血に対するアスコルビン酸や蛋白質の作用機作は各々異なったものであり、この結果より鉛中毒時の貧血に蛋白質とアスコルビン酸の同時投与が有効であることが確認された。

序 文

女性に多く発生する貧血の原因となる栄養素としてアスコルビン酸(A_sA)¹⁾、葉酸、ビタミンB₁₂、鉄²⁾、蛋白質などが知られており、更に鉛中毒時に貧血が起こることが知られている³⁾。これらは貧血の発生機序がそれぞれ異なっているため、これらが複合して起こった場合の相

互関係を知ることは極めて興味深い。今回はA_sA、蛋白質、鉛と貧血の相互関係について取り上げてみた。

A_sA欠、低蛋白質、鉛摂取により貧血が生ずるが、この原因のひとつとして赤血球生成機能の低下があり、それはグロビン蛋白質合成能の低下、鉄の利用率の低下、ヘム合成能の低下が考えられる。

本報においては第一段階としてヘム合成能に及ぼすこれら栄養素の影響について研究を行い、興味ある結果を得たので報告する。

実 験 方 法

実験動物として初体重250g前後のハートレー系雄モルモット24匹を1回の実験に用い、2回実験を繰り返した。

飼育方法は、室温22°C、湿度60%の12時間明暗交代の恒温動物室で飼育した。

飼料組成としてコーンスターチ、ミルクカゼインを基本とし、加熱してビタミンCを破壊したアルファルファをそれに添加して用いた。カゼインは12%または20%になるようにコーンスターチを調整し、ビタミンCは対照群のみに0.1%になるように飼料中に添加した。塩混合4、混合ビタミン(除ビタミンC)、大豆油4の組成で飼料及び水は自由摂取させ、鉛非投与群には蒸留水を与え、鉛投与群には1500ppmの硝酸鉛溶液を与えた。

血液中の鉛定量法は、血液を硫酸、硝酸によって湿式

灰化した後、ジチゾン四塩化炭素によって抽出し、さらに濃硝酸で逆抽出した。分離した鉛は原子吸光度計 (VARIAN-TECHTORON, AA-5) で測定した。

ビタミンCの定量は組織ホモジネート液に5%メタリン酸を加えた後、2, 4-ジニトロフェニールヒドラジン溶液を加えるRoeの方法により定量した⁴⁾。酵素活性としてNADPH-Cytochrome C Reductaseの測定を行った。0.01M, NADPH 0.1ml; 0.01M 2, 6-ジクロロフェノールインドフェノール0.01ml; 0.01M KCN 0.01mlをpH7.4、0.1Mトリス緩衝液に加え、0.1mlの酵素液を加えることにより37°Cで反応させ、Gilfordの分光光度計を用いて測定した。ALA合成酵素、ALA脱水酵素はそれぞれ骨髄及び肝臓のホモジネートを酵素液として用い、別表に示すごとくGranikの測定法を一部修飾して用いた。⁵⁾

実験結果

モルモットの体重曲線を第1図に示した。この表からも分かるように、20%カゼイン食投与群が12%カゼイン食投与群より発育がよく、鉛非投与群が鉛投与群よりも発育がよかった。第一表に肝臓、脳、脾臓、心臓、腎臓、睪丸の重量を示した。この表からも分かるように各臓器

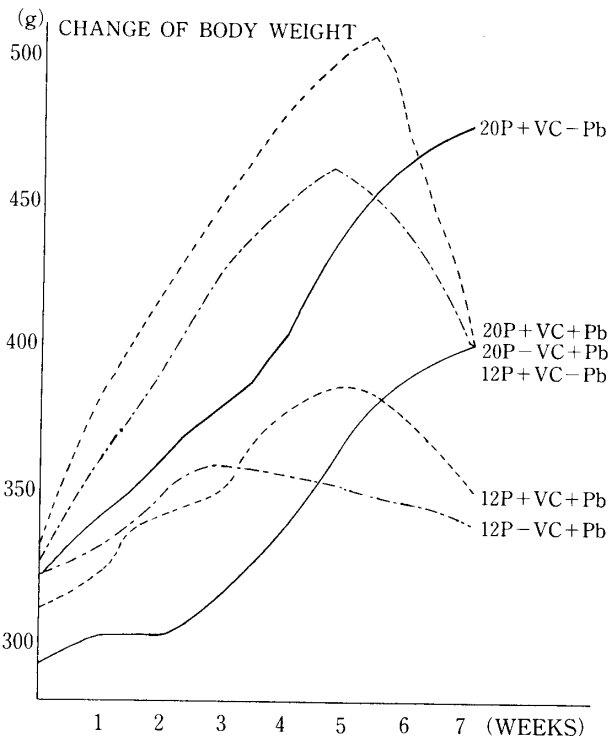
ともに重量にほとんど変化が見られなかった。ただ脾臓のみ鉛投与群において異常に肥大していた。また肉眼的所見も赤黒色に着色し、異常を思わせた。

第二表に血液中の鉛含有量を表した。鉛投与群は非投与群に比べて多くなっていたが、ビタミンC投与の影響は余り出ていなかった。また12%カゼイン食群が28μg/10g、21.7μg/10gと低値を示し、蛋白質食摂取による鉛取り込み量の減少を示していた。

第三表は肝臓におけるアスコルビン酸量を表す。この表でも分かるようにアスコルビン酸投与群では非投与群に比べ、量は増加していたが、カゼイン摂取量や鉛摂取の影響は余り出ていなかった。このことからアスコルビン酸は鉛の解毒に直接影響はないと考えられた。

第四表は貧血の指標であるヘマトクリット値を示している。この表から分かるように20%カゼイン食が12%カゼイン食よりも、アスコルビン酸投与群が非投与群よりも、鉛非投与群が投与群よりもヘマトクリット値が高くなっており、これらはいずれも貧血防止に有効であることを示している。

第2図は肝臓マイクロゾームにおける薬物代謝系を示している。肝臓においてはある種の薬物や毒物はマイクロゾ



第1図 モルモットの体重曲線
20Pは20%カゼイン食投与、12Pは12%カゼイン食投与群を示す

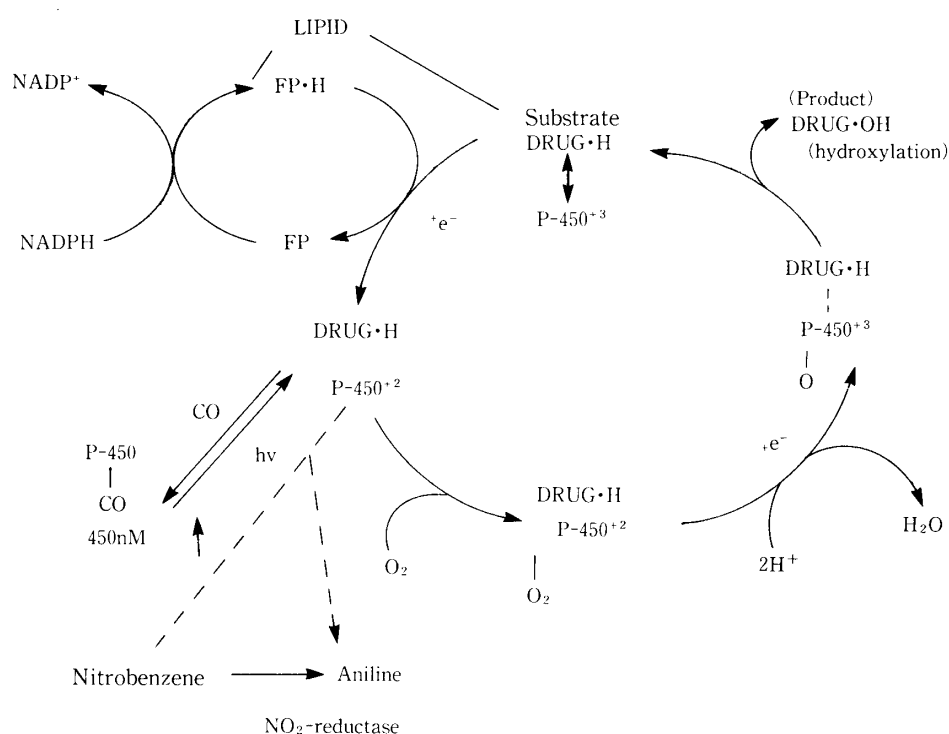
第一表 臓器重量 (g)

	肝臓	脳	脾臓	心臓	腎臓	睪丸
12P+VC-Pb	14.9	3.3	0.30	1.3	3.3	1.7
12P+VC+Pb	18.7	3.6	3.49	1.5	3.6	1.3
12P-VC+Pb	16.1	3.6	2.08	1.3	3.4	1.7
20P+VC-Pb	21.4	3.3	0.42	1.7	3.6	1.9
20P+VC+Pb	18.6	3.7	2.29	1.5	4.7	1.9
20P-VC+Pb	18.3	3.8	1.92	1.5	3.9	2.2

第二表 血中鉛濃度 (μg/10g Blood)

	mean ± SE
12P+VC-Pb	0.7 ± 0.0
12P+VC+Pb	28.6 ± 2.0
12P-VC+Pb	28.5 ± 3.9
20P+VC-Pb	2.2 ± 0.0
20P+VC+Pb	36.2 ± 5.8
20P-VC+Pb	21.7 ± 3.0

貧血に及ぼす鉛、蛋白質及びビタミンCの影響



第2図 ミクロソームの薬物代謝系

第三表 肝臓中アスコルビン酸量

	mg/g Organ
12P+VC-Pb	0.058
12P+VC+Pb	0.055
12P-VC-Pb	0.003
12P-VC+Pb	0.007
20P+VC-Pb	0.093
20P+VC+Pb	0.122
20P-VC-Pb	0.005
20P-VC+Pb	0.002

第四表 ヘマトクリット値

	(ml Erythrocytes/100ml Blood)
12P+VC-Pb	33.3
12P+VC+Pb	25.2
12P-VC+Pb	19.6
20P+VC-Pb	37.6
20P+VC+Pb	29.1
20P-VC+Pb	23.8

ームでこの図に示されたような酵素系により水酸化されて解毒される。その水酸化にはビタミンCも関与し、更にヘムを含むP-450やCytochrome Cも含まれているといわれている。そこでこの酵素系の律速酵素となっているNADPH-Cytochrome C reductase活性を測定してみた。その結果は第五表に示したとおり、アスコルビン酸投与、鉛非投与群において活性の上昇が見られた外はあまり大差がなく、鉛投与群においてはむしろ低下していた。このことより鉛の解毒には肝ミクロゾームの酵素系は関与していないことが考えられる。

貧血は鉛中毒時に現れる症状のひとつであるが、貧血の原因のひとつである赤血球合成能の低下は、グロビン蛋白質の生合成能の低下、鉄の利用不能、ヘム合成能の低下などが考えられるが、今回はヘム合成能を取り上げて考えてみた。赤血球のヘム合成能は第3図に示したように、主に骨髄においてグリシンとサクシニルC。Aとよりδ-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS) の作用を受けてδ-アミノレブリン酸になり、更にδ-アミノレブリン酸脱水酵素 (ALAD) の作用を受けてポルホビリンノーゲンになり、その後種々の中間代謝産物を経てヘムになることが分かっている。今回は上記のヘム合成酵素系の律速段階となっているALAS及び鉛中毒の作用を受けやすいといわれているALADの酵素活性を測定した。

第五表

NADPH-CYTOCHROME C REDUCTASE活性
(Activity/mg Protein)

12P+VC-Pb	4.3±0.5
12P+VC+Pb	3.0±0.1
12P-VC+Pb	3.2±0.3
20P+VC-Pb	4.1±0.1
20P+VC+Pb	3.3±0.6
20P-VC+Pb	2.9±0.4

第六表

METHOD OF ALA SYNTHETASE ASSAY

Incubation mixture

- Enzyme solution 0.5ml
- Yellow solution 1.0ml
- 1M Glycine 0.2ml
- 10mM Succinyl CoA 0.6ml

Incubation time 60min.

Added 0.3M TCA.

Centrifuged at 3,000×g for 10min.

Passed through Dowex-50 column.

Eluted by 2M-Pyridine.

Boiled with 0.3ml of ethylacetate for 10min.

Passed through Dowex-1 column.

Eluted by 12M acetic acid.

Added 0.5ml of Ehrlich reagent.

Measured at 525nm and 555nm.

ALASの活性は第6表に示した方法により測定した。またこの結果は第4図に示した。ALASは貧血の場合代償的に活性が上昇する性質ももっている。この表からも分かるように20%カゼイン食の場合は12%カゼイン食よりも低く、A_sA投与群が非投与群よりも低くまた鉛非投与群が投与群よりも低くなっていたが、これらはいずれも貧血の程度と逆の関係を示している、代償的に活性が上昇したことを示している。

第七表はALAD活性の測定法である。これによる測定結果は第5図に示したとおりである。すなわち12%カゼイン食と20%カゼイン食による差はほとんど認められなかったが、鉛投与により活性は著しく押さえられた。またA_sA投与によっても活性は中程度上昇していた。このことから蛋白質や鉛、A_sAなどと貧血との関係はおたがいの相関性が少ないことが分かった。

第七表

METHOD OF ALA DEHYDRASE ASSAY

Incubation mixture

- Enzyme homogenate 0.15ml
- 0.3M Reduced glutathione 0.05ml
- 0.1M Phosphate buffer, pH7.4 0.4ml

Incubated for 30min.

Added 0.1M of δ-aminolevulinic acid.

Incubated for 30min., again.

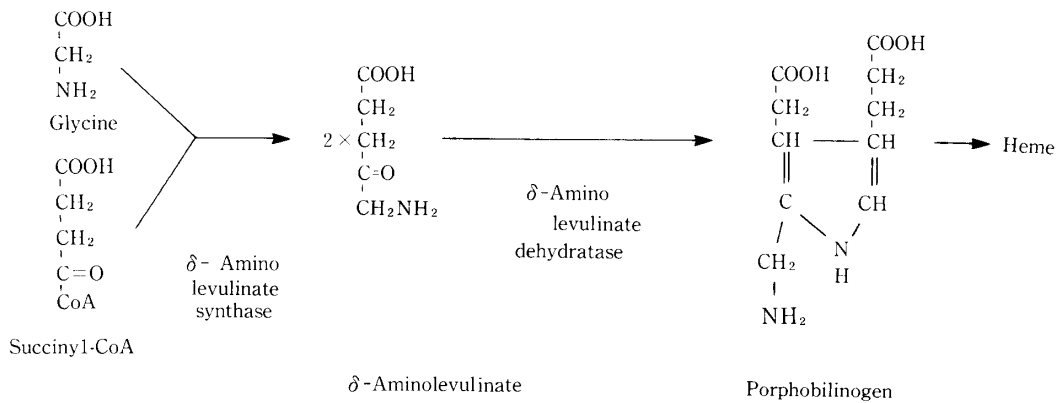
Added 0.75ml of 10% TCA.

Centrifuged at 3,000×g for 10min.

Added 1.5ml of Ehrlich reagent.

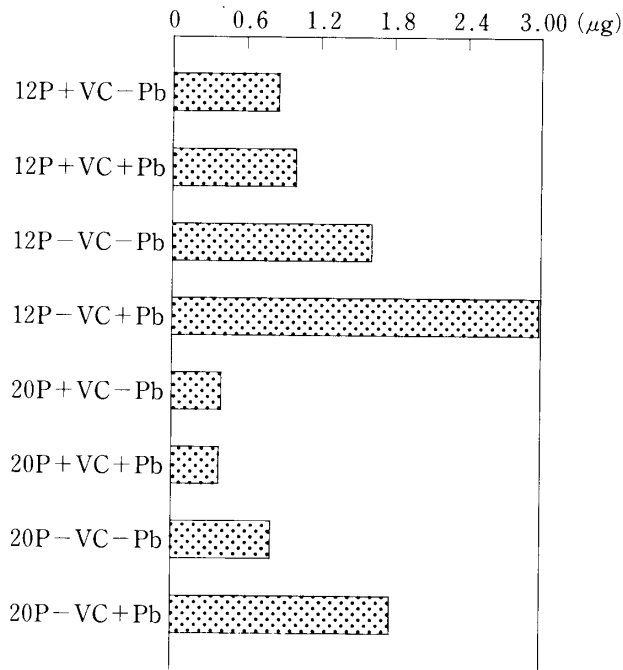
Measured at 555 nm.

BIOSYNTHESIS OF HEME



第3図 ヘム合成経路

貧血に及ぼす鉛、蛋白質及びビタミンCの影響



第4図

ALA SYNTHETASE ACTIVITY

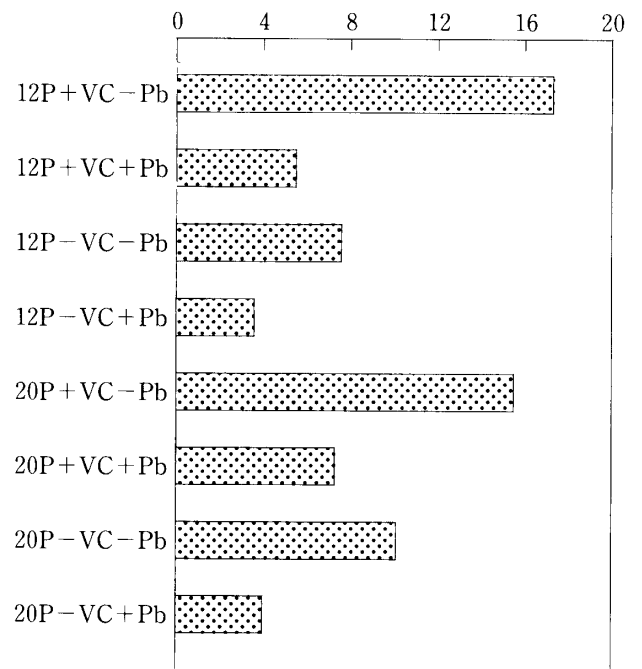
(ALA formed/hour of incubation per 100mg of bone marrow)

考 察

貧血は女性に多く発生し、国民栄養調査によれば血色素量が11.9g/dl以下のものは男子では2%前後にすぎないが、女子では20%を上廻っている。その原因としては子宮筋腫などの臓器異常による出血過多があげられる。その予防には臓器摘出がいはれるが、そのほかに栄養療法として鉄剤、蛋白質、ビタミンC、ビタミンB₁₂、葉酸、ビタミンB₆の投与が行われる。

貧血の原因としてはそのほかに寄生虫によるもの、鉛中毒などがある。このうち鉛によるものは貧血の発生機構として他のものと異なり、興味あるものである。そこで今回は鉛、蛋白質、ビタミンCについてその貧血との関係を見てみた。

鉛投与時における血液中の鉛濃度の増加を押さえるものとして、蛋白質が特に効果があった。おそらく蛋白質が消化管中で鉛と結合体をつくり、鉛の吸収を押さえるためと思われる。これに反してビタミンCは鉛中毒には余り効果がないと思われた。ビタミンCは農薬などの有機毒物に対しては、肝臓中のミトコンドリア中のCytochrome P-450量を増加したり、またNADPH-Cytochrome reductase活性を増加することにより解毒作用を



第5図

ALA DEHYDRATASE

(μg of ALA disappeared/hour of incubation per 2 mg of protein)

示すが無機物質には解毒作用を示さないことが言われており、この実験でも鉛の解毒には肝臓のミクロゾームの酵素系は関与しないことが示されている。

ただ貧血の予防効果はビタミンC投与も、高蛋白質投与も、鉛を投与しないことでも血液中のヘマトクリット値の上昇を示すことが分かり、いずれも貧血防止に効果があることが示された。

鉛中毒は貧血発生の機構が他のものと異なり、ヘム骨格生合成の抑制という興味あるものである。そのため今回はヘム合成の律速酵素であるδ-アミノレブリン酸合成酵素 (ALAS) とδ-アミノレブリン酸脱水酵素 (ALAD) に及ぼす鉛、蛋白質、ビタミンCの影響についてその影響を見た。ALADは鉛投与によりもちろん大きく押さえられ、ビタミンC投与により活性の回復が見られたが、蛋白質はそれほど影響を示さなかった。逆にALASは貧血の場合、代償的に活性が増加する性質をもっている。そこで蛋白質、ビタミンC投与はかえって活性が低下し、鉛投与により逆に活性が上昇した。このような作用を示す酵素は時々見られるが、そのメカニズムについてはこれから研究されねばならない分野であろう。

本実験をするに当たって共同実験者としての協力をお願いした国立健康・栄養研究所の横田フミ、早川徳子、及び文化女子大学の土屋治美各氏に感謝する。

文 献

- 1) Derman, D. P., T. H. Bothwell, A. P. MacPhail, J. D. Torrance, W. R. Benzwoda, R. W. Charlton & F. G. H. Mayet, Importance of ascorbic acid in the absorption of iron from infant foods., Scand. J. Haematol., 25 : 193-201 (1980)
- 2) P. R. Dallman, R. Yip and C. Johnson, Prevalence and causes of anemia in the United States, Amer. J. Clin. Nutr., 39, 437-4458 (1984)
- 3) Smith, H. D., Pediatric lead poisoning. Arch. Environ. Health, 8, 256-261 (1964)
- 4) J. H. Roe, & Kaether, C. A., J. Biol. Chem., 147, 399 (1943)
- 5) D. Mauzerall and S. Granik, J. Biol. Chem., 219, 435 (1956)