

〔原著〕 松本歯学 6 : 173~178, 1980

ヒ素化合物による赤血球膜浸透圧抵抗の変化

都筑新太郎, 山口由理子, 前橋 浩

松本歯科大学 歯科薬理学教室 (主任 前橋 浩 教授)

徳 植 進

松本歯科大学 総合診断学・口腔外科学教室 (主任 徳植 進 教授)

Osmotic Fragility of Rat Erythrocytes Caused by Arsenic Compounds

SHINTARO TSUZUKI, YURIKO YAMAGUCHI and HIROSHI MAEHASHI

*Department of Dental Pharmacology, Matsumoto Dental College
(Chief: Prof. H. Maehashi)*

SUSUMU TOKUUE

*Department of Oral Diagnostics and Surgery, Matsumoto Dental College
(Chief: Prof. S. Tokuuue)*

Summary

Coil planet centrifugation was used to measure osmotic fragility in rat erythrocytes treated with arsenic compounds *in vitro* and *in vivo*. Arsenic trioxide given orally to rats caused a significant increase in the osmotic fragility at a dose level of 20 ~ 120 mg As/kg of body weight. However, *in vitro* tests on the erythrocytes, which were treated with 2 ~ 500 μ g As/ml of blood for 1 hr. incubation at 37°C, no significant changes were observed. Monomethylarsonic acid and dimethylarsinic acid, known as metabolites of inorganic arsenic, induced no significant changes in the osmotic fragility *in vitro* tests on the erythrocytes. Moreover, these compounds did not show any changes even when rats received i. p. injection of 20 mg As/kg of body weight. In case of sodium arsenate, oral administration of 60 mg As/kg of body weight caused a significant increase in the osmotic fragility. In inducement of the osmotic fragility in the erythrocytes sodium arsenate appeared to be less active than arsenic trioxide.

結 言

三酸化ヒ素には腐蝕作用があり、歯髄失活の目的に用いられる。酸やアルカリの腐蝕作用と異なり、原形質毒として作用し、細胞の SH 基酵素を阻害し、呼吸系を抑える。血管にも作用して出血を起し血行障害を来すので、これらの結果として細胞死がもたらされる⁸⁾。三酸化ヒ素中毒では貧血も起こるが、これは血管に対する作用や造血障害によるとされる⁸⁾。このようにヒ素の血液に対する作用に関して、ヒ化水素に強い溶血作用が知られているもの³⁾、三酸化ヒ素には特別な記載はないようである。しかし動物実験においてヒ素は血中で赤血球に含まれるので、赤血球膜に対して何らかの作用があると予想されよう。

赤血球膜の脆弱性を測定するのに、従来は一定希釈度の食塩水の系列に血液を加えて、溶血度を測定するという方法 (Parpart 法) が採られて来たが、Coil Planet Centrifuge (CPC) 法は細いポリエチレンチューブに一定の濃度勾配をつけて食塩水を満たし、その中を高浸透圧側より低浸透圧側へ赤血球を移動させて溶血部位を測定するという方法である。これは操作が簡単で、しかも測定の精度や再現性もよく、動的に膜抵抗の測定を行ないうるといわれている¹⁾。血液疾患の他、最近肝・胆道疾患で特異な溶血パターンを示すことが知られて臨床検査に広く使われるようになった¹⁾。そこで今回、CPC を用いてヒ素化合物の赤血球膜に対する影響について動物実験を行なったので報告する。

実験方法

Coil Planet Centrifuge (CPC): CPC の原理²⁾ は長さ約 3 m の細いポリエチレンチューブに一定の濃度勾配をつけて食塩水を満たしたものを一種の遠心管としてこの一端に血液を注入し、両端を閉じて特殊な遠心器にかけ、遠心力によって血液を一定速度でチューブ中を高浸透圧側から低浸透圧側へ移動させると、ある濃度のところで溶血が起り溶血帯を形成することによる。この溶血帯の位置、形状によって赤血球膜の脆弱性を測定することができる。このチューブは実際はプラスチック棒 (長さ約 17 cm) に巻きつけてあり、これをコイルという。

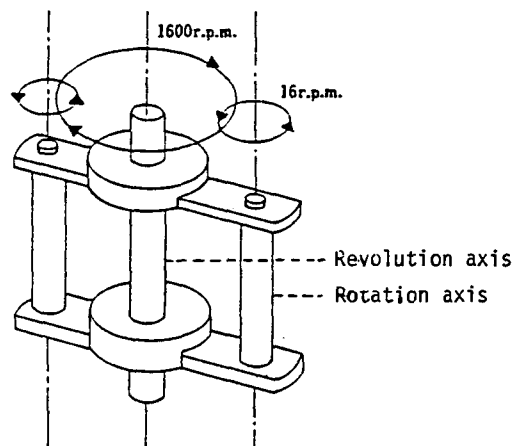
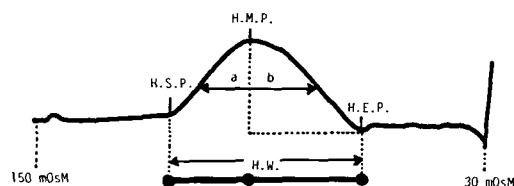


Fig. 1. Schematic structure of coil planet centrifuge



H. S. P.	Hemolysis Start Point
H. M. P.	Hemolysis Maximum Point
H. E. P.	Hemolysis End Point
H. W.	Hemolysis Width
a/b	Shape of Hemolysis

Fig. 2. Hemolytic pattern

遠心器は Fig. 1 に示すように高速公転 (1,600 rpm) をする主軸と低速自転 (16 rpm) をする自軸よりなり、自軸は主軸に対して対称の位置に 2 本あり、これにそれぞれ 6 本ずつのコイルがとりつけられるようになっている。

コイルに生じた溶血帯は走査型光電光度計によってチャート上に溶血パターンとして記録される。

溶血帯は Fig. 2 に示すような曲線で Scale を用いて溶血開始点 (H. S. P.)、最大溶血点 (H. M. P.)、溶血終了点 (H. E. P.) を読みとり CPC 値とする。CPC 値としてこの他に溶血巾 (H. W.) や溶血の型 (a/b) を測定することもあるが⁵⁾、これらについては今回はあまり有意な結果を得なかつたので省略する。

実験動物: Wistar 系ラットの雄、体重 250 g 前後のものを使用した。採血は心臓穿刺により行い、

血液凝固阻止剤にはヘパリンを用いた。

ヒ素化合物：ヒ素化合物として三酸化ヒ素（半井化学），ヒ酸ナトリウム（半井化学），モノメチルヒ酸ナトリウム（Pfaltz & Bauer 社），ジメチルヒ酸ナトリウム（半井化学）を用いた。

in vitro の実験：ヒ素化合物の一定量をラットの血液に添加し 37°C で1時間インキュベートした。その後 CPC を用いて赤血球膜抵抗を測定した。添加量は血液 1 ml に対し 0.02~0.04ml とした。

in vivo の実験：ラットにヒ素化合物を経口投与又は腹腔内投与し，経時的に屠殺し採血を行って，直ちに CPC 値を測定した。

実験結果

1) 三酸化ヒ素の経口投与実験

三酸化ヒ素を経口投与した後，経時的に採血した血液を用いて CPC 値を測定した。60 mg As/kg と 120 mg As/kg 投与例を Table. 1 に示し，Fig. 3 はそれを図に示したものである。また 20~60 mg As/kg 投与例を Fig. 4 に示した。図に示すように，30~120 mg As/kg 投与では投与後 1~2 時間で赤血球膜抵抗の低下が認められ，20 mg As/kg 投与では 4 時間以後に低下が認められた。

2) 三酸化ヒ素の in vitro 実験

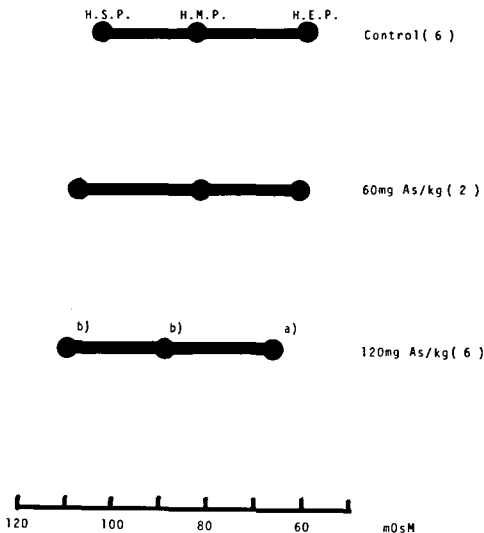


Fig. 3. Osmotic fragility of rat erythrocytes. In vivo test of arsenic trioxide. Rats were killed at 2 hr. after oral administration. (): Number of rats. a) $p < 0.05$ b) $p < 0.01$

三酸化ヒ素は経口投与実験において膜抵抗の低下が認められたので in vitro 実験においても同様の結果が認められるかどうかを調べた。ヒ素の in vitro 濃度として血液 1 ml に対して 2~500 μg を添加し 37°C で1時間インキュベートしたが，赤血球膜抵抗の変化に一定の傾向は認められなかった (Fig. 5 および Table. 2)。

3) ヒ酸ナトリウム，モノメチルヒ酸ナトリウムおよびジメチルヒ酸ナトリウムの in vitro 実験

三酸化ヒ素の in vitro 実験においてヒ素濃度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで行ったが特に変化を認めなかった。三酸化ヒ素の生体内代謝物といわれるヒ素化合物について in vitro 実験を行った。すなわち 5 価のヒ素化合物としてヒ酸ナトリウム，メチル化された化合物としてモノメチルヒ酸ナトリウム，およびジメチルヒ酸ナトリウムについて検討した。

その結果上記の化合物は血液 1 ml に対してヒ素

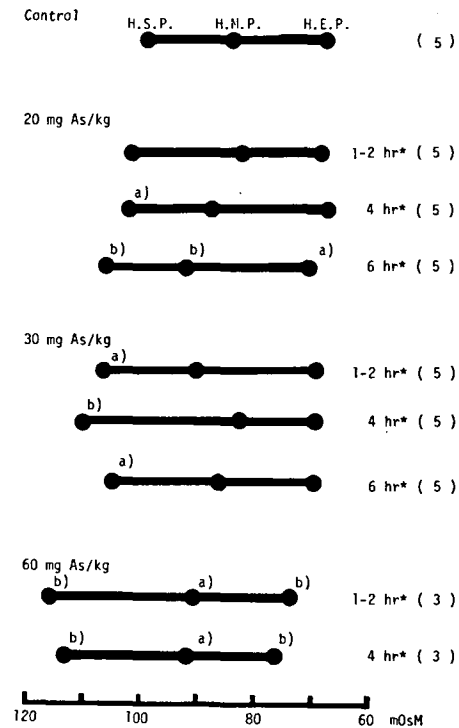


Fig. 4. Osmotic fragility of rat erythrocytes. In vivo test of arsenic trioxide *Time after oral administration. (): Number of rats. a) $p < 0.05$ b) $p < 0.01$

Table 1. Osmotic fragility of rat erythrocytes by oral administration of arsenic trioxide

Group	No.	(Mean ± S.D.)		
		H.S.P.	H.M.P.	H.E.P.
Control	6	103.3 ± 3.1	82.5 ± 2.6	60.0 ± 1.5
60 mg As/kg	2	108.0 ± 6.0	85.0 ± 2.0	61.0 ± 1.0
120 mg As/kg	6	109.8 ± 4.2*	88.7 ± 3.2**	65.7 ± 2.1†

* p < 0.05 ** p < 0.01 Blood was drawn 2 hr. after administration.

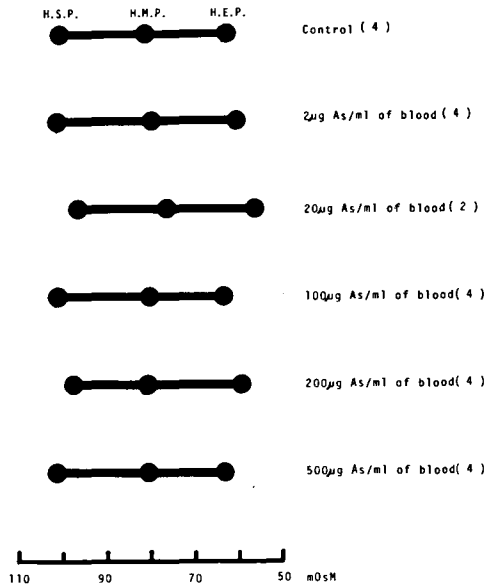


Fig. 5. In vitro osmotic fragility test of arsenic trioxide in rat erythrocytes. (): Number of blood samples.

Table 2. In vitro osmotic fragility test of arsenic trioxide in rat erythrocytes

Group (Concentration of arsenic)	No.	(Mean ± S.D.)		
		H.S.P.	H.M.P.	H.E.P.
Control	4	99.9 ± 5.1	81.0 ± 4.7	61.8 ± 5.3
2 µg/ml	4	101.3 ± 2.3	79.5 ± 3.5	58.8 ± 2.2
20 µg/ml	2	96.5 ± 1.5	76.0 ± 2.0	56.5 ± 0.5
100 µg/ml	4	102.1 ± 6.7	81.7 ± 5.6	63.2 ± 5.3
200 µg/ml	4	96.5 ± 3.0	80.5 ± 2.9	59.3 ± 1.5
500 µg/ml	4	104.0 ± 8.6	81.5 ± 4.4	63.4 ± 6.0

Blood was incubated with arsenic trioxide at 37°C for 1 hr.

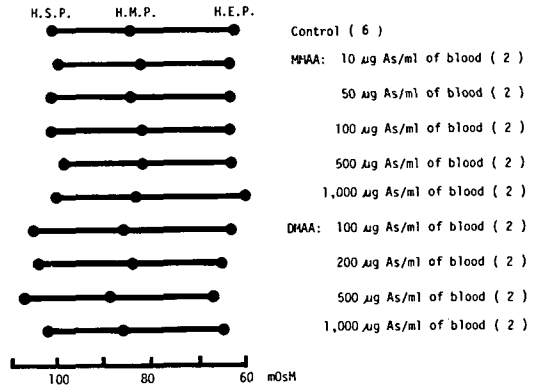


Fig. 6. In vitro osmotic fragility test of monomethylarsonic acid (MMAA) and dimethylarsinic acid (DMAA) in rat erythrocytes. (): Number of blood samples.

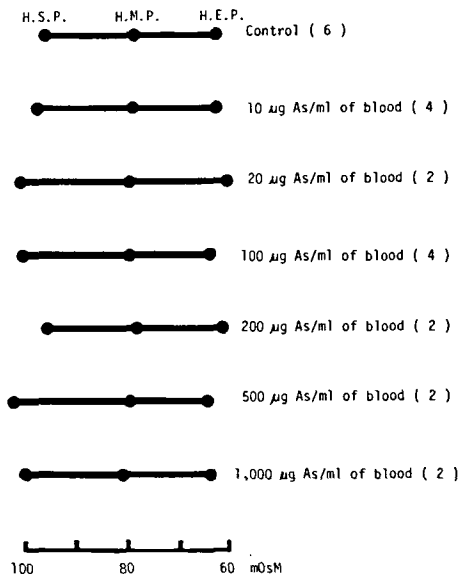


Fig. 7. In vitro osmotic fragility test of sodium arsenate in rat erythrocytes. (): Number of blood samples.

として、1,000 µg の濃度まで添加したが、いずれも膜抵抗の変化に一定の傾向は認められなかった (Fig. 6, 7).

4) ヒ素化合物の腹腔内投与実験

一般に薬物の作用は経口投与よりも腹腔内注射の場合の方が強くあらわれるので、今回用いた4種の化合物について腹腔内注射によって膜抵抗の

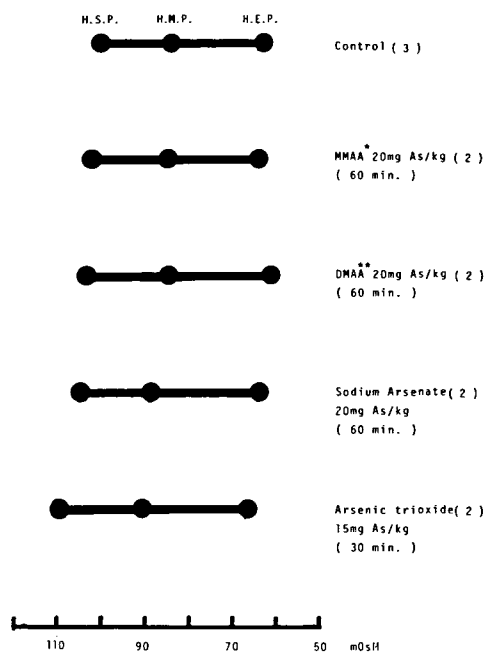


Fig. 8. Osmotic fragility of rat erythrocytes. In vivo test of arsenical compounds. Rats were killed at 30-60 min. after i. p. injection. *Mono-methylarsonic acid. **Dimethylarsonic acid. (): Number of rats.

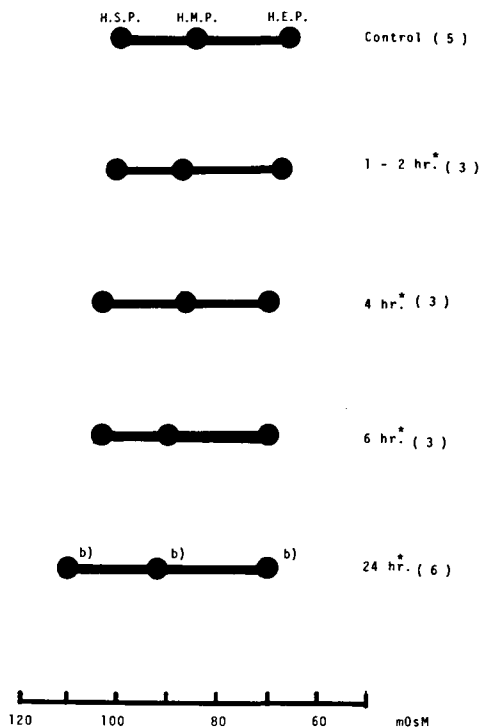


Fig. 9. Osmotic fragility of rat erythrocytes. In vivo test of sodium arsenate. *Time after oral administration of 60 mg As/kg. (): Number of rats. b) $p < 0.01$

変化を調べた。

三酸化ヒ素のみはヒ素として 15 mg/kg を投与し30分後に採血したが、ヒ酸ナトリウム、モノメチルヒ酸ナトリウム、およびジメチルヒ酸ナトリウムについてはヒ素として 20 mg/kg を投与し1時間後に採血して直ちに CPC 値を測定した。各群とも例数が少ないので統計処理はできないが、三酸化ヒ素の他にヒ酸ナトリウムにもわずかに膜抵抗の低下がうかがえるようであった (Fig. 8)。

5) ヒ酸ナトリウムの経口投与実験

ヒ酸ナトリウムは腹腔内注射で膜抵抗の低下のあることがうかがえたので、三酸化ヒ素と同様に経口投与によって膜抵抗低下作用の有無を調べた。ヒ素に換算して 60 mg/kg を投与し経時的に採血を行って CPC 値を測定した結果、24時間後の採血例で有意の膜抵抗の低下が認められた (Fig. 9)。

考 察

CPC は赤血球膜の脆弱性を精度よく、しかも迅速に測定できるので、溶血性貧血の診断はもとより肝・胆道疾患の診断、経過観察、予後の判定にも応用されている¹⁾。薬物毒性の分野でも赤血球膜に対する作用をみるため、この装置を利用したいくつかの研究がみられる^{4) 5) 6) 7) 10)}。われわれも今回、ヒ素化合物について赤血球膜に対する作用を調べた。

ヒ素には SH 基酵素阻害作用があるが、同様な作用を有する鉛に赤血球膜の脆弱性に低下作用のあることが報告⁷⁾されているので、ヒ素にも赤血球膜に対する何らかの作用があると予想された。今回の結果では三酸化ヒ素は in vivo において膜抵抗の低下作用があったが、in vitro においては特に変化は認められなかった。そこで三酸化ヒ素の体内代謝物に膜抵抗を低下させるものがあるか

どうかを調べた。山内ら⁹⁾は三酸化ヒ素の代謝物として5価のヒ素とメチル化されたヒ素化合物を推定し、これらを測定している。そこで今回もそれらについて *in vitro* 実験を行ったが、結果は否定的であった。山内ら⁹⁾によると赤血球中のヒ素は大部分がジメチル体であったというが、このような代謝物は一般に解毒機序とみる方が妥当で、これに特別な毒性を見出すことはできないと思われる。このことは今回の *in vivo*, *in vitro* 実験においても示されている。しかし5価のヒ素については今後更に検討を要すると思われる。すなわち *in vivo* 実験においてヒ酸ナトリウムにも三酸化ヒ素に比べて程度は弱い膜抵抗の低下作用が認められたからである。

三酸化ヒ素について *in vivo* では赤血球膜の脆弱性が認められ、*in vitro* では変化が認められなかった理由は種々考えられるが、ヒ素が赤血球膜に直接何らかの作用を及ぼすとすればヒ素の赤血球中への移行に関し *in vivo* と *in vitro* の差異について検討してみる必要がある。

結 論

三酸化ヒ素はラットを用いた *in vivo* 実験において赤血球膜浸透圧抵抗の低下を生じた。しかし *in vitro* 実験では変化は認められなかった。三酸化ヒ素の体内代謝物といわれる5価のヒ素（ヒ酸ナトリウム）およびメチル化物のモノメチルヒ酸ナトリウム、ジメチルヒ酸ナトリウムについて *in vivo* 実験と *in vitro* 実験を行なった結果、ヒ酸ナトリウムの経口投与で三酸化ヒ素に比して弱い膜抵抗の低下作用を認めた以外に変化は認められなかった。そこで *in vivo* 実験と *in vitro* 実験にお

けるヒ素の赤血球への移行に差異があるかどうかを調べるのが今後の課題となろう。

文 献

- 1) 安藤 喬, 吉田 洋, 寺倉俊勝, 深沢俊男, 高橋善弥太 (1977) 肝・胆道疾患における赤血球浸透圧抵抗, 日消誌, 74: 329~339.
- 2) 動的赤血球膜物性検査装置, 概要集 (1978) パイオメディカルシステムズ.
- 3) Fowler, B. A., Ishinishi, N., Tsuchiya, K. and Vahter, M. (1979) "Arsenic" in the Handbook on the toxicology of metals, 291-319, edited by L. Friberg et al., Elsevier/North Holland Biomedical Press, Amsterdam.
- 4) 後藤 健, 宮田昌幸, 小林紳一, 天野高志, 浜田晃実, 住友雅人, 古屋英毅 (1978) 局所麻酔薬 (lidocaine) 中毒時の赤血球膜浸透圧抵抗について—CPCによる検索—. 日歯麻誌, 6: 7~13.
- 5) 市川久次, 小林博義, 中尾順子 (1975) Coil Planet Centrifuge 法によるラット赤血球浸透圧抵抗, 東京衛研年報, 26-2: 203~206.
- 6) 市川久次, 小林博義, 中尾順子 (1976) ジブチルヒドロキントルエン (BHT) のラット赤血球浸透圧抵抗におよぼす影響に関する研究, 東京衛研年報, 27-2: 53~55.
- 7) 唐井一郎, 福本紘一, 堀口俊一 (1979) Coil Planet 型遠心分離器によるかいウサギ赤血球浸透圧抵抗に及ぼす鉛の影響. 産業医学, 21: 458~459.
- 8) 堤 璋二, 伊藤春生, 前橋 浩, 中井一仁 (1977) 歯学薬理学, 210~216. 学建書院, 東京.
- 9) 山内 博, 岩田昌恵, 山村行夫 (1980) ラットにおける三酸化ヒ素の代謝と排泄. 産業医学, 22: 111~121.
- 10) 柳浦才三, 鈴木 勉, 三戸秀敏, 宍戸愛子 (1979) Morphine および Phenobarbital 依存と赤血球膜浸透圧抵抗について. 日薬理誌, 75: 117~126.