

# ヒト赤血球のグリセリン溶血に対する銅及び (有機)水銀化合物の単独及び複合作用

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

宮 地 芳 之

(昭和62年2月27日受稿)

Key words : Copper, Organic mercury  
Erythrocytes  
Glycerol Lysis

## 緒 言

赤血球にグリセリンを加えて溶血率を測定することは、赤血球の異常を知るスクリーニングテストとして、迅速かつ、簡単な方法である。1948年 Le Ferre<sup>1)</sup>により、 $6 \times 10^{-7}$  M 銅イオンで、わずかに赤血球全表面の1%を覆うにたる量で、グリセリンの侵入を90%抑制することが注目されるに至った。

今回、我々は貴金属の生体膜に与える単独及び複合作用の研究の一環としてヒト赤血球を選び、多種にわたる重金属イオンを作用させた結果、銅、有機水銀化合物のPCMB (Sodium p-chloromercuribenzoate)、同様に有機水銀化合物で過去にイモチ病の農薬として用いられていたEMP (Etylmercury Phosphate) にグリセリン溶血阻害作用を認め、その単独、及び複合作用を濃度と孵置時間の両面から検討したのでその成績をここに報告する。

## 実 験 方 法

実験方法はGottfried-Robertsonの方法<sup>2)</sup>により行った。即ち、ヒトの全血25 $\mu$ lをPhosphate Buffer Saline (pH7.4) 5 ml 中に加え、よく攪はんし、この希釈された血液1 ml 中に重金属試薬30 $\mu$ lを添加、37°Cで一定時間孵置した後、0.3 M グリセリン2 ml を加え625 nm にて経時的

に吸光度を測定した。吸光度の測定にはHITACHI Model 100-60 Spectrophotometer を使用した。

尚、重金属試薬は全て特級を用い、ヒト血液は採血後24時間以内のものを使用した。

## 実 験 結 果

多岐にわたる重金属イオンをヒト赤血球に作用させた結果、銅、PCMB、EMP にグリセリン溶血阻害作用を認めた。これら重金属イオンの単独作用として、濃度及び孵置時間を変えて、グリセリン溶血時間を測定した。又、複合作用として、同濃度による銅とPCMB混合液、銅とEMP混合液及びこれらの単独液についてグリセリン溶血時間を測定した。

単独作用について

### 1) 銅によるグリセリン溶血時間

銅の濃度変化が及ぼすグリセリン溶血時間の変化について測定結果を図1に示す。図1において明らかな如く、4~20 $\mu$ Mの濃度範囲において、濃度の増加に伴い溶血時間の延長を認めた。又、銅の孵置時間の変化が及ぼすグリセリン溶血時間の変化についての測定結果を図2に示す。図2から明らかな如く、孵置時間の延長に伴い、逆に溶血時間は、短縮されている。特に、40分から60分の孵置時間の範囲において、著大な溶血時間の短縮が認められた。

### 2) PCMBによるグリセリン溶血時間

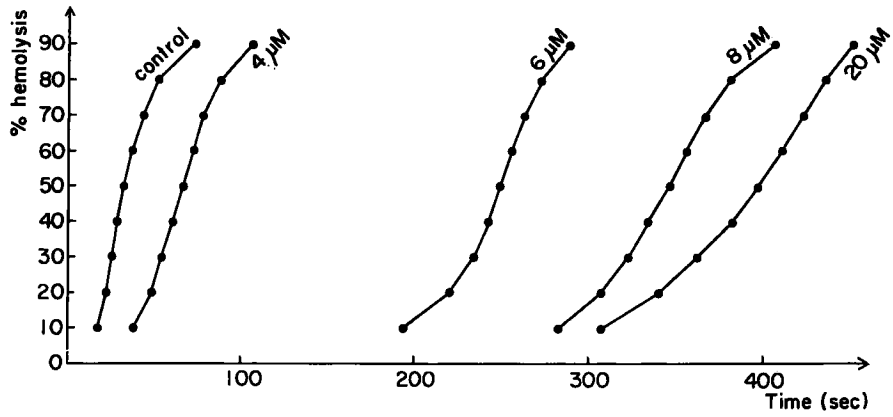


图1 甘油溶血时间在不同浓度的CuCl<sub>2</sub> (4, 6, 8 和 20 μM) (30 min 孵育)

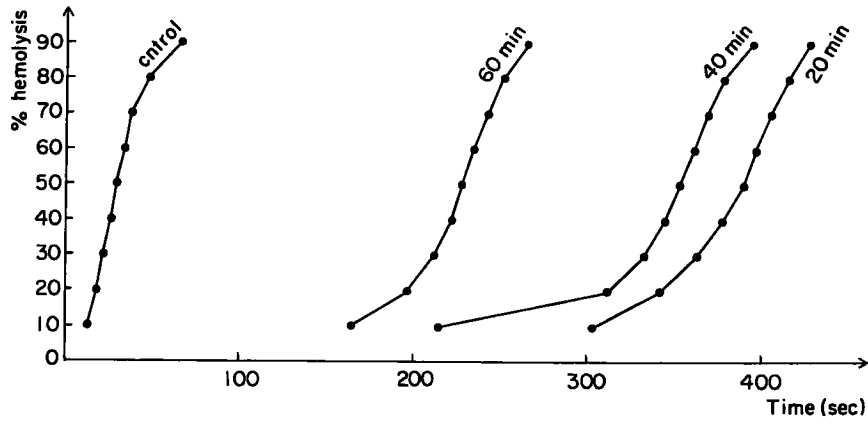


图2 100 μM CuCl<sub>2</sub> 孵育时间对甘油溶血时间的影响 (20, 40 和 60 分钟)

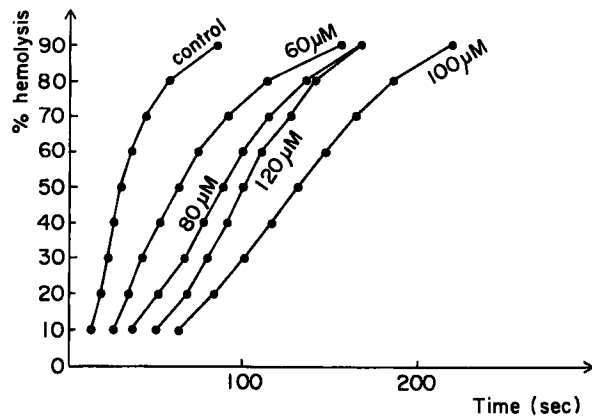


图3 甘油溶血时间在不同浓度的PCMB (60, 80, 100 和 120 μM) (30 min 孵育)

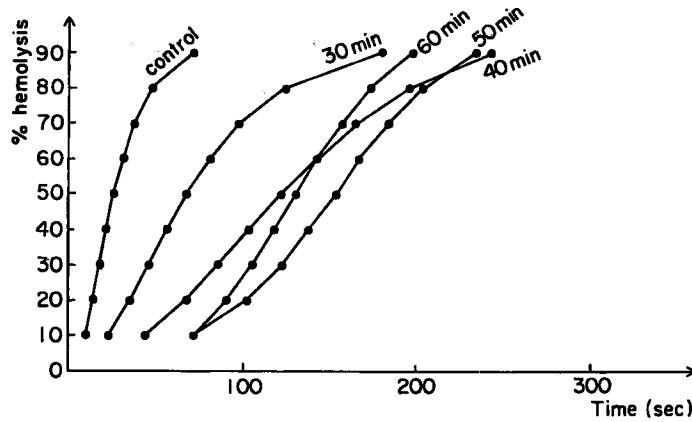


図4 Effect of incubation period on the glycerol lysis time in human bloods with  $100\ \mu\text{M}$  PCMB. (30. 40. 50 and 60 min)

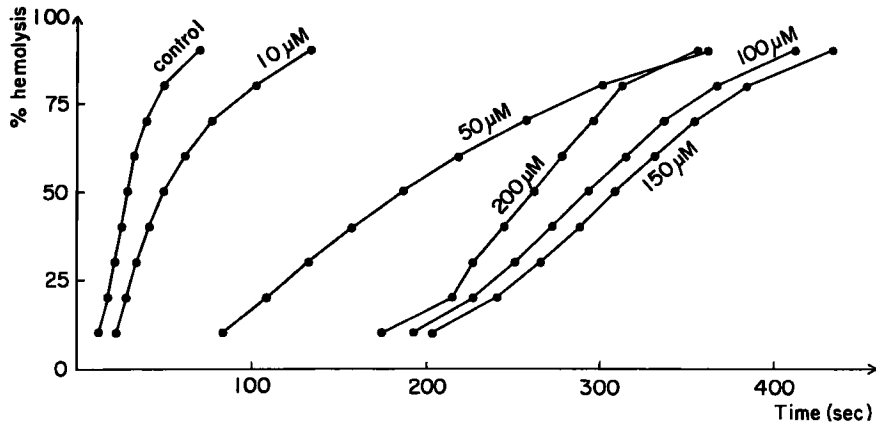


図5 Glycerol lysis time at various grades of hemolysis in human bloods with EMP. (10. 50. 100 and 150  $\mu\text{M}$ ) (30 min incubate)

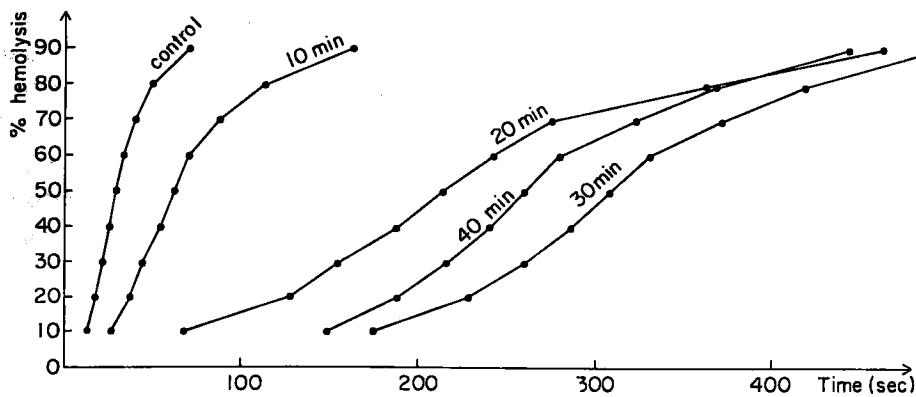


図6 Effect of incubation period on the glycerol lysis time in human blood with  $100\ \mu\text{M}$  EMP. (10. 20. 30 and 40 min)

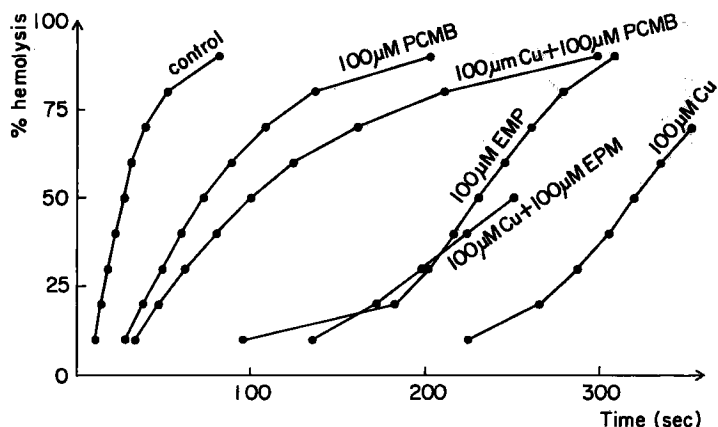


図7 Glycerol lysis time in human bloods with  $\text{CuCl}_2$ , PCMB, EMP and their mixture. (30 min incubate)

PCMBの濃度変化が及ぼすグリセリン溶血時間の変化について、測定結果を図3に示す。

60  $\mu\text{M}$  から 100  $\mu\text{M}$  の濃度範囲において、濃度の増加に伴い溶血時間の延長が認められているが、120  $\mu\text{M}$  濃度では逆に溶血時間の短縮が認められた。PCMBの孵置時間の変化が及ぼす溶血時間の変化を図4に示す。30分から50分の孵置時間の範囲では、孵置時間の増加に伴い溶血時間の延長が認められるが、60分では、逆に溶血時間の短縮が認められた。

### 3) EMPによるグリセリン溶血時間

EMPの濃度変化が及ぼす溶血時間の変化について、測定結果を図5に示す。10  $\mu\text{M}$  から 150  $\mu\text{M}$  の濃度範囲において、濃度が増加するに伴い溶血時間の延長が認められ、200  $\mu\text{M}$  では逆に溶血時間の短縮が認められた。EMPの孵置時間の変化が及ぼすグリセリン溶血の変化を図6に示す。10分から30分の孵置時間の範囲では、孵置時間の増加に伴い溶血時間の延長が認められるが、孵置時間が40分の場合には、30分の孵置時間に比較して、逆に溶血時間の短縮が認められた。

#### 複合作用について

図7において明らかな如く、銅とPCMBの混合液、銅とEMPの混合液では、それぞれ銅とPCMB、銅とEMPの中間の阻害作用となる。即ち、銅と有機水銀化合物の混合液によるグリセリン溶血に対する阻害作用は、強い銅イ

オンの阻害作用と、弱い水銀イオンとの仲間の阻害作用を示した。

## 考 察

グリセリンのような非電解質で透過性のある物質の溶液中では、コロイド浸透圧のために内部の浸透圧が高くなり、細胞膜はこの浸透圧の差に耐えられず、破壊が起こる。しかしこの場合、侵入した水の為に赤血球容積が増大し、最大160%程度までは耐えられるが<sup>3)</sup> ついに破壊が起こる。これは各所にヘモグロビンを通過させるだけの小孔が多数あき、内容物が拡散する為である。

このようなグリセリンによる溶血作用に対し、銅イオン、モノヨード酢酸、PCMBが、低濃度で阻害作用を有することが知られている<sup>4)</sup>。今回我々は、多数の重金属イオンをヒト赤血球膜に作用した結果、さらにEMPにグリセリン溶血阻害作用を認めた。これら金属イオンの濃度を変えて赤血球膜に作用させた結果、ある一定濃度までは、濃度の増加に伴いグリセリン溶血阻害作用が促進されたが、それ以上の濃度に達すると、かえってグリセリン溶血阻害作用が抑制される傾向を示した。ヒト赤血球との接触時間を変化させた結果、前述の濃度の場合と同様に、あゆ一定時間までは、接触時間の延長に伴い、グリセリン溶血阻害作用は抑制される傾向が認められた。即ちグリセリン溶血阻害作用は、金

属イオン濃度と孵置時間の2つの要因の相関により、影響を受けると考えられる。又、これら金属イオンを同濃度で作用させた結果、銅>EMP>PCMBの順に強い阻害作用を有することが認められた。銅と有機水銀化合物を混合し、複合的に製用させた結果、これら単独における作用の中間の阻害作用を示したが、これは、銅と有機水銀化合物が同一の部位に作用し、競合阻害を起こすものと考えられる。

これまで、銅のグリセリン溶血阻害作用に関して、動物の種により、赤血球膜の透過性に差があること<sup>4)</sup>、又、動物の種の違いにより、膜脂質の構成成分に違いがあること<sup>5)</sup>から、グリセリンの透過性と膜脂質の構成成分には相関がある<sup>6-7)</sup>ことが知られている。一方、Gottfried<sup>2)</sup>、Wessels<sup>8)</sup>は、膜脂質の構成成分は、グリセリンの透過性に影響を与えるが、重要な要因ではないと報告している。

又、銅の赤血球膜に対する作用について LeFevre<sup>1)</sup>は、非常に低濃度の銅により、グリセリンの膜透過性を阻害すること、及び銅、ヨード、水銀はいずれもSH基との親和性を有することから、ヒト赤血球におけるグリセリンの膜透過性に関し、SH基を有する酵素活性又は、

少なくとも膜表面に局在するSH基に関係があるのではないかと示唆した。

今回我々の実験においても、銅、PCMB、EMPについて、同一部位への阻害作用が示唆されたので、ヒト赤血球膜に局在するSH基と何らかの関連があるのではないかと推察される。

## 結 論

銅、有機水銀化合物としてPCMB及びEMP(イモチ病農薬)を選び、その単独液及び両者混合液による阻害作用を検討し、以下の成績を得た。

1. 銅イオンはグリセリン溶血に対する強い阻害作用を有し、その阻害度は濃度と孵置時間に依存する。
2. EMP (Etylmercury phosphate) 及びPCMB (Sodium p-chloromercuribenzoate) はグリセリン溶血に対する阻害作用を有し、その阻害度は濃度と孵置時間に依存する。
3. 銅・EMP混合液、銅・PCMB混合液によるグリセリン溶血に対する阻害作用は、強い銅イオンと弱い水銀イオンとの中間の阻害作用を示した。

## 文 献

1. LeFevre PG: Evidence of active transfer of certain non-electrolytes across the human red cell membrane. *J Gen Physiol* (1948) 31, 505-527.
2. Gottfried EL, Robertson NA: Glycerol lysis time as a screening test for erythrocytes disorders. *J Lab Clin Med* (1974) 83, 323-333.
3. Ponder E: Hemolysis and related Phenomena, Grune Stratton (1948).
4. Meyerstein N and Yagil R: Glycerol permeability of camel and hamster erythrocytes. *FEBS Lett* (1975) 54, 180-182.
5. Nelson GJ: Blood lipids and lipoproteins: Quantitation, Composition, and Metabolism, Nelson ed, Wiley-Interscience. in New York (1970) pp 317-387.
6. Van Deenen LLM and De Gier J: Chemical composition and metabolism of lipid in red blood cells. Bishop and Surgenor eds. Academic Press, New York (1964) pp 243-307.
7. Gottfried EL and Robertson NA: Glycerol lysis time as a screening test for erythrocyte disorders. *J Lab Clin Med* (1974) 83, 323-333.
8. Wessels JMC and Veerkamp JH: Some aspects of the osmotic lysis of erythrocytes. 3. Comparison of glycerol permeability and lipid composition of red blood cell membranes from eight mammalian species. *Biochim Biophys Acta* (1973) 291, 190-196.

**Effects of copper, organic mercury and a mixture of the two  
on glycerol lysis of erythrocytes.**

**Yoshiyuki MIYAJI**

**Department of Public Health, Okayama University Medical School,**

**2-5-1 Shikata-cho, Okayama Japan.**

**(Director : Prof. M. Ogata)**

The effects of copper, organic mercury and a mixture of the two on glycerol lysis of erythrocytes were examined. Copper ion and organic mercury (EMP; ethylmercury phosphate, and PCMB; sodium p-chloromercuribenzoate) inhibited glycerol lysis of erythrocytes. The inhibitory effects was dependent on the incubation period. An equimolar solution of copper ion and EMP showed between copper ion and EMP. Similar results were obtained with copper and PCMB.