

高原氏病に出現する口腔壊疽についての実験的研究

第 2 編

無カタラーゼ血液症血液および正常人血液に対する 過酸化水素産生菌の作用

岡山大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任：高原滋夫教授*)
(指導：緒方正名教授**)

三 谷 恭 夫***

〔昭和44年10月2日受稿〕

第1章 過酸化水素産生菌による家鴨血液 および家兎血液における時間的経 過によるメトヘモグロビンの蓄積

第1節 緒言

第1編において、血液、口腔粘膜などの「カ」活性の低い家鴨の口蓋粘膜下にそれ自体「カ」を保有しない H_2O_2 産生菌の1種である肺炎双球菌(Ⅱ型)を注射して高原氏病に類似した病変をつくることができた。

H_2O_2 はヘモグロビンの生体内における分解にも関与しているといわれている²³⁾。高原により発見された無「カ」血液症はヘモグロビンの H_2O_2 による分解にたいする疑問の解明に一つの鍵を提供した。すなわち、「カ」活性の極めて低い血液に H_2O_2 を加えると、「カ」活性が極めて低いために H_2O_2 は HbO_2 に直接作用しこれを瞬時に酸化させて MetHb に変え血液は黒褐色を呈する。また、酸素を発生しないため気泡の発生はみられない。MetHb はさらに変化を受け透明な propentdyopent まで分解されると説明されている²⁴⁾。

「カ」活性の極めて低い血液と H_2O_2 産生菌との関係については、宮本⁹⁾、河田²⁵⁾ の報告があるが、これら H_2O_2 産生菌により産生される H_2O_2 によりできる MetHb の蓄積に関する報告は見当たらない。

著者はとくに第1章においては「カ」活性の極めて低い家鴨の血液を用い、対照として「カ」活性の正常な家兎血液を用いて、肺炎双球菌(Ⅱ型)、溶血

性連鎖状球菌、緑色連鎖状球菌などの H_2O_2 産生菌によつて産生された量としては少いが高濃度の H_2O_2 によつて HbO_2 が時間的にいかなる変化を受けるかについて MetHb 濃度を Mills²⁶⁾ の方法により測定した。

第2節 実験材料

a) 供試細菌：東大伝研より分与された肺炎双球菌(Ⅱ型)(DP-2, Type 2) (以下 Dp. pneum. と略す)、溶血性連鎖状球菌(T1, Group A, Type 1) (以下 St. haem. と略す)、緑色連鎖状球菌(39) (以下 St. virid. と略す) の3種で、いずれもそれ自体「カ」を保有しないか極めて少量であり、しかも H_2O_2 を菌体外に産生するとされているものである。

b) 供試血液：「カ」活性の極めて低い家鴨の血液(D-B と略す)をその翼関節内側を走っている翼静脈より採血した。対照として「カ」活性の正常な家兎の血液(R-B と略す)をその耳静脈より採血しこれを用いた。

c) 血液加液体培地の作製：上記のようにして採血した各血液 5 cc にたいして heparin (1 cc 中に 1000 単位含有) 1 滴を加えたもの 0.5 cc をブイヨン 4.5 cc に混合して作製した(D-B (heparin 加) 0.5 cc + Boillon 4.5 cc を A で、R-B (heparin 加) 0.5 cc + Boillon 4.5 cc を B で表わす)。

第3節 実験方法

Dp. pneum., St. haem., St. virid. の各々を血液寒天平板培地にて好氣的に純粋培養した後、各細菌を湿菌量にして 0.1/3 mg 宛前節のように作製した家鴨

* 岡山大学医学部耳鼻咽喉科学教室

** 岡山大学医学部公衆衛生学教室

*** 岡山大学医学部耳鼻咽喉科学教室大学院生

或いは家兎の血液を加えた液体培地(AおよびB)で37°Cで好氣的に培養し、3日後、6日後にAおよびBを蒸留水で10倍に稀釈溶血させた(全血の100倍に稀釈されている)後、D-Bでは核を有するため、8000rpm 10分間、3回遠沈をおこない、その上清について Mills の方法により MetHb 濃度を測定し全ヘム量に対する百分率で表わした。

第4節 実験成績

前節で述べた方法にしたがつて、Dp. pneum., St. haem., St. virid. の各々を家鴨の血液を加えた液体培地(A)および家兎血液を加えた液体培地(B)で培養し、培養3日目および6日目の家鴨血液および家兎血液の HbO₂ から MetHb への変化を Mills の方法により測定し、MetHb 濃度を全ヘム量に対しての百分率で表わしたところ Table 1, Table 2 のごとき結果をえた。

Table 1. metHb concentration in per cent of total heme compounds in duck blood

	metHb conc. (%)	
	3 d.	6 d.
Diplococcus pneumoniae (Type II)	20.7	89.8
Streptococcus haemolyticus	24.1	80.5
Streptococcus viridans	24.1	94.7

Table 2. metHb concentration in per cent of total heme compounds in rabbit blood

	metHb conc. (%)	
	3 d.	6 d.
Diplococcus pneumoniae (Type II)	8.9	40.0
Streptococcus haemolyticus	9.1	43.5
Streptococcus viridans	6.0	40.5

a) Dp. pneum. : 家鴨血液では培養3日目で20.7% 6日目で89.8%の MetHb 産生を、家兎血液では培養3日目で8.9%、6日目で40.0%の MetHb の産生をみた。両血液共溶血は肉眼的には認められなかつた。

b) St. haem. : 家鴨血液では培養3日目で24.1%、6日目で80.5%の MetHb 産生を認め、家兎血液では3日目で9.1%、6日目で43.5%の MetHb の産生をみた。家鴨血液は軽度溶血し、家兎血液は中等度溶血していた。

c) St. virid. : 家鴨血液では培養3日目に24.1% 6日目で94.7%、家兎血液では3日目で6.0%、6日目で40.5%の MetHb 産生をみた。なお両血液

共肉眼的に溶血は認められなかつた。

第5節 総括および考按

以上の実験成績を総括すると

1) Dp. pneum., St. haem., St. virid. を家鴨血液あるいは家兎血液加液体培地(AおよびB)で培養すれば、家鴨の HbO₂ も、家兎の HbO₂ も酸化されて MetHb となつた。

2) MetHb 濃度は各細菌の培養時間とともに増加し、細菌の種類による影響は大差を認めなかつた。

3) 「カ」活性の低い家鴨の血液は、「カ」活性の正常な家兎の血液より著明な MetHb 産生を認めた。

4) 肉眼的な溶血は、St. haem. を培養した家鴨血液で軽度、家兎血液で中等度認めたのみで、他の菌では認められなかつた。

これらのことは、折田⁷⁾は HbO₂ の分解に作用させる H₂O₂ の濃度が稀釈された場合には作用時間が重要な因子となると述べているし、宮本⁹⁾、土井¹²⁾は常時口腔に棲息しているこれら H₂O₂ 産生菌が異常に繁殖した場合に無「カ」血液症患者に潰瘍形成をみることがあると説明している。更に河田によれば無「カ」血液症の血液加培地で著明な MetHb 生成が認められ、これは菌の生成する H₂O₂ によつてもたらされたと推定している。これらの実験成績など考えあわせて著者の実験成績は、細菌により産生された H₂O₂ が「カ」活性の低い血液に作用した場合に血液中の HbO₂ が酸化されて MetHb を形成し、更にそれが時間的に蓄積され局所の酸素欠乏を生ずるであろうという点に対し意味があると思われる。

第6節 結論

「カ」活性の極めて低い家鴨の血液あるいは「カ」活性の正常な家兎の血液を加えた液体培地を用いて、「カ」を保有しないでしかも H₂O₂ を産生するといわれている Dp. pneum., St. haem., St. virid. の各々を、37°Cで好氣的に培養し、これらの細菌が産生する H₂O₂ により各血液の HbO₂ の分解によつて生ずる MetHb 濃度を Mills の方法により測定し次の結果を得た。

1) 家鴨の血液および家兎の血液とも MetHb の生成をみ、更に培養時間とともに MetHb 濃度は増大し蓄積される。

2) 家鴨の血液では、家兎血液に比較して、著明な MetHb の生成を認める。

3) *St. haem.* を培養した培地にのみ両血液で肉眼的に溶血を認めたが、溶血しない血液と比較して、MetHb 濃度には差を認めなかつた。

4) 以上のごとく、家兔血液に比較し家鴨血液で MetHb 濃度が著しく高いということは、家鴨の血液の「カ」活性が極めて低いために、菌の産生する H₂O₂ によつてもたらされた結果であろうと推定される。

第2章 無カタラーゼ血液症患者血液および正常人血液における過酸化水素による変化の経時的観察

第1節 緒言

第1章では「カ」活性の低い家鴨の血液および「カ」活性の正常な家兔血液を用い、H₂O₂ 産生菌により産生された H₂O₂ によりそれらの血中の HbO₂ が酸化されて MetHb が産生され、しかも時間的に蓄積されることをみた。

本章では次章の予備実験として、「カ」活性の極めて低い無「カ」血液症患者の血液および対照として「カ」活性の正常な正常人血液を使用し、その HbO₂ が H₂O₂ により受けるであろうと予想される変化をみるために第3節の実験方法に述べるように cellophane bag を用いて各種濃度の H₂O₂ を緩徐にしかも連続的に HbO₂ に作用させて automatic recording spectrophotometer (Beckman DK-2) を用いて時間的に吸収スペクトルの面より客観的に追求し、特に HbO₂ の H₂O₂ による分解過程において MetHb が産生されるといわれているため²⁷⁾²⁸⁾、この MetHb にはとくに注目して吸収曲線の追求をおこなつた。また同時に MetHb 濃度を Mills の方法により測定した。

第2節 実験材料

a) 供試血液：「カ」活性の極めて低いとされている中山家系¹⁸⁾の無「カ」血液症患者の血液を肘静脈より採血し、血液 5 cc にたいし heparin (1 cc 中に1000単位含有) 1 滴を加えこれを使用した。対照としてカタラーゼ活性の正常な正常人血液を同様に heparinize して用いた。

b) H₂O₂ 水：市販の H₂O₂ を予め Warburg 氏検圧装置を用いて藤田、児玉氏法²⁹⁾により濃度を測定し、これに蒸留水を加えて 0.0005%, 0.005% に希釈して使用した。

第3節 実験方法

無「カ」血液症の血液 0.5 cc を生理的食塩水

4.5 cc に混合したもの (Ac-B と略す) および正常人血液 0.5 cc を生理的食塩水 4.5 cc に混合したものの (Norm-B と略す) を作製し、その各々 (Ac-B および Norm-B) を別々の太い試験管に入れた。次に 0.005% の H₂O₂ 水 (0.005%-H₂O₂ と略す) 2 cc, 0.0005% の H₂O₂ 水 (0.0005%-H₂O₂ と略す) 2 cc および対照として蒸留水 (0%-H₂O₂ と略す) 2 cc の各々を cellophane bag に入れたものを上記のようにして作製した血液と生理的食塩水を混合したものの (Ac-B および Norm-B) の中に1つ宛入れ (即ち Ac-B + 0.005% -H₂O₂, Ac-B + 0.0005% -H₂O₂, Ac-B + 0% -H₂O₂, Norm-B + 0.005% -H₂O₂, Norm-B + 0.0005% -H₂O₂, Norm-B + 0% -H₂O₂ の6種を作製) 無菌的に 5°C に保つた。それらを3日目、および6日目に蒸留水を加えて10倍に希釈溶血させた (全血の100倍に希釈されている) 後、8000 rpm 10分間、3回遠沈をおこない、その上清について automatic recording spectrophotometer (Beckman, DK-2) を用いて MetHb 産生の度合をその吸収曲線により観察し、更に Mills の方法により MetHb 濃度を測定し全ヘム量に対する百分率で表わした。なお、本実験で MetHb とあるのは酸性 MetHb の意である。

第4節 実験成績

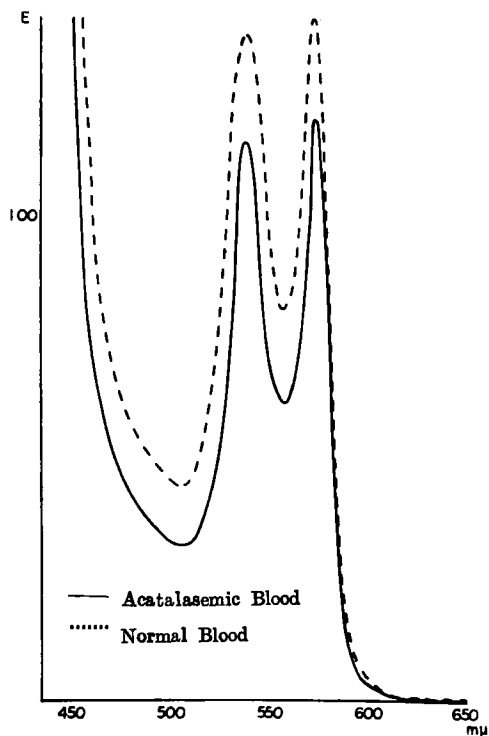
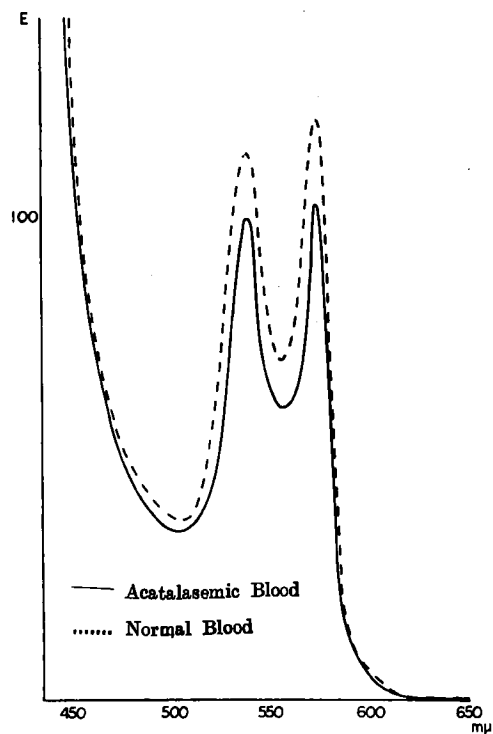
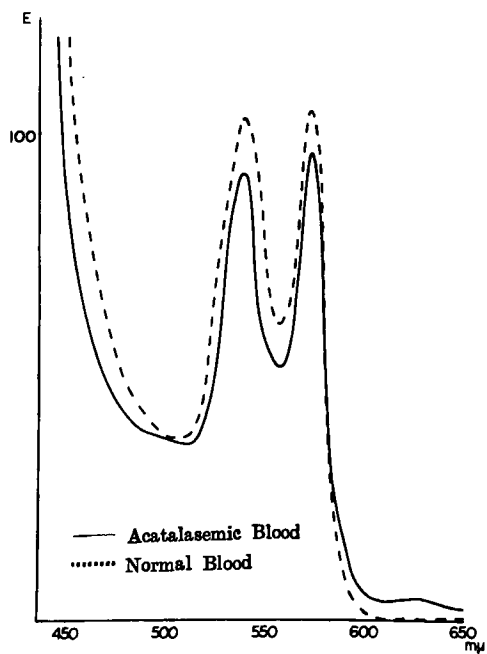
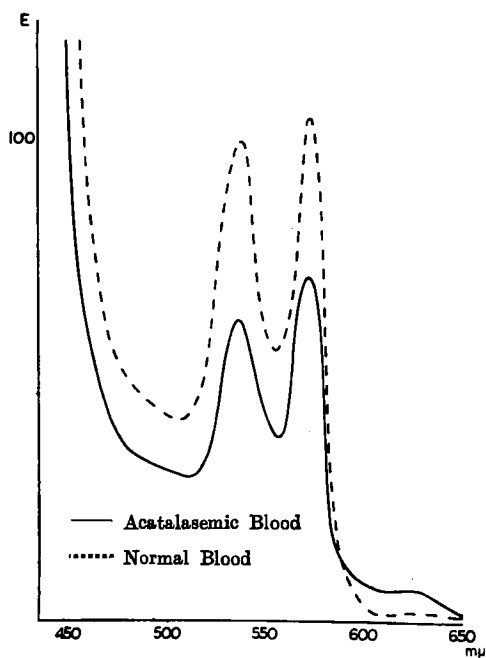
前節の方法にしたがつておこなつた無「カ」血液症の血液および正常人血液に各種濃度の H₂O₂ による時間的経過による吸収像の変化、および MetHb 濃度は Fig. 1~Fig. 6 および Table 3, Table 4 に示すごとくである。

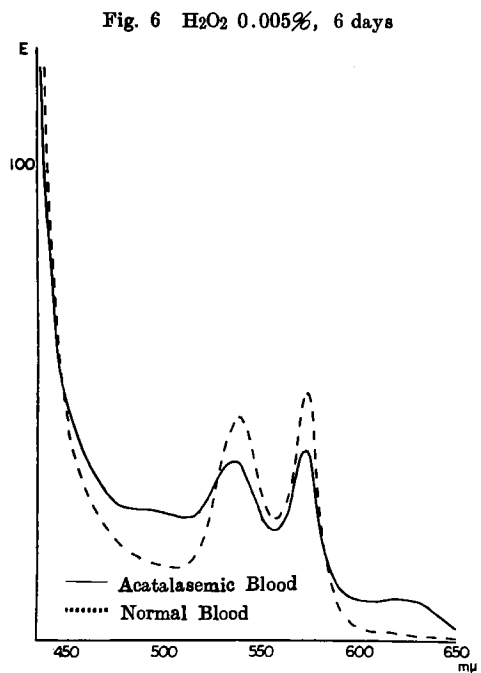
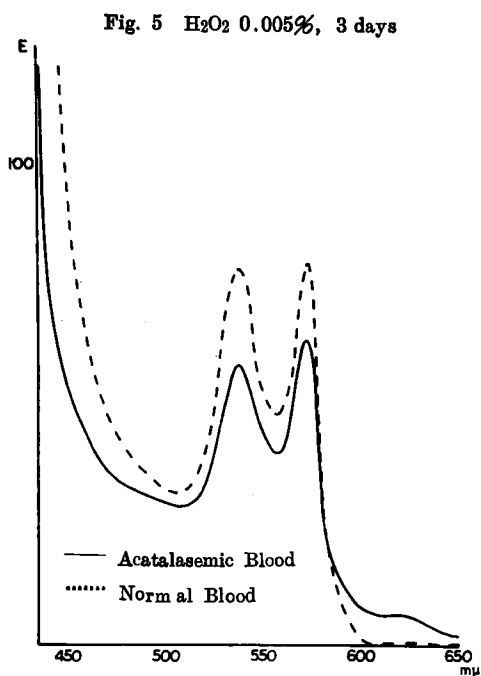
Table 3. metHb concentration in per cent of total heme compounds in normal human blood

H ₂ O ₂ conc. (%)	metHb conc. (%)	
	3 d.	6 d.
0	5.3	12.4
0.0005	5.5	13.7
0.005	6.1	15.1

Table 4. metHb concentration in per cent of total heme compounds in acatalasemic blood

H ₂ O ₂ conc. (%)	metHb conc. (%)	
	3 d.	6 d.
0	6.3	16.5
0.0005	13.4	22.4
0.005	25.5	40.6

Fig. 1 H_2O_2 0%, 3 daysFig. 2 H_2O_2 0%, 6 daysFig. 3 H_2O_2 0.0005%, 3 daysFig. 4 H_2O_2 0.0005%, 6 days



A) 正常人血液に H₂O₂ を cellophane bag より透析させた場合の吸収像の変化および MetHb 濃度

a) 蒸溜水 (Norm-B+0%·H₂O₂) の場合

Fig. 1 および Fig. 2 のごとく HbO₂ の典型的な吸収曲線である 540m μ ~542m μ および 576m μ ~

578m μ (以下 540m μ と 578m μ で代表する) に吸収峰 (吸収極大) が認められる。540m μ および 578m μ の吸収極大は 3 日目に比較し 6 日目では低下している。しかし酸性 MetHb に一致する 500m μ および 630m μ の吸収極大は認められない。全ヘムに対する MetHb 濃度は 3 日目で 5.3%, 6 日目で 12.4% であつた。

b) 0.0005% H₂O₂ (Norm-B+0.0005%·H₂O₂) の場合

Fig. 3 および Fig. 4 のごとく 540m μ および 578m μ に吸収極大を有する HbO₂ の吸収像が認められるが、酸性 MetHb に一致する 500m μ および 630m μ の吸収極大は 3 日目では認められないが、6 日目では 630m μ に僅かに認められる。MetHb 濃度は 3 日目で 5.5%, 6 日目で 13.7% であつた。

c) 0.005% H₂O₂ (Norm-B+0.005%·H₂O₂) の場合

Fig. 5, Fig. 6 のごとく HbO₂ の吸収極大は認められるが、6 日目にはそれらの吸収極大は著明に低下している。酸性 MetHb に一致する 500m μ , 630m μ の吸収極大は 3 日目には認められないが、6 日目には 630m μ で僅かに認められる。MetHb 濃度は 3 日目で 6.1%, 6 日目で 15.1% となつた。

B) 無「カ」血液症血液に H₂O₂ を cellophane bag より透析させた場合の吸収像の変化および MetHb 濃度

a) 蒸溜水 (Ac-B+0%·H₂O₂) の場合

Fig. 1, Fig. 2 のごとく HbO₂ に一致する 540m μ , 578m μ の吸収極大は認められ、6 日目の両吸収極大は 3 日目のものに比較し低下している。しかし 500m μ , 630m μ の吸収極大は認め難い。MetHb 濃度は 3 日目で 6.3%, 6 日目で 16.5% である。

b) 0.0005% H₂O₂ (Ac-B+0.0005%·H₂O₂) の場合

Fig. 3, Fig. 4 のごとく HbO₂ の吸収極大は 3 日目で Ac-B+0%·H₂O₂ の 6 日目の吸収像 (Fig. 2) と同程度に低下し、更に 6 日目では一層低下する。酸性 MetHb については、3 日目に 630m μ の吸収極大は明らかに出現し、500m μ でも吸収曲線が扁平化しているのが認められ、6 日目になるとこの傾向が一層著明となる。MetHb 濃度は 3 日目で 13.4%, 6 日目で 22.4% となつた。

c) 0.005% H₂O₂ (Ac-B+0.005%·H₂O₂) の場合

Fig. 5, Fig. 6 のごとく HbO₂ の吸収極大は 3 日目で著明に低下し、6 日目では更に低下している。

酸性 MetHb の $630\text{m}\mu$ の吸収極大は3日目で認められ、 $500\text{m}\mu$ で吸収曲線が扁平化しており、6日目には $630\text{m}\mu$ の吸収極大は一層著明となり、 $500\text{m}\mu$ にも僅かに吸収極大を認めるようになる。MetHb 濃度は3日目で25.5%、6日目で40.6%となった。

第5節 総括及び考按

以上の実験結果を総括すれば、

1) 作用させる H_2O_2 の濃度が本実験のごとく非常に低濃度にもかかわらず、 HbO_2 の $540\text{m}\mu$ および $578\text{m}\mu$ の吸収極大は時間の経過とともに低下しており、その濃度が高ければ、吸収像の変化も急激であり、 HbO_2 の分解も急速におこるものと考えられる。

2) HbO_2 の $540\text{m}\mu$ および $578\text{m}\mu$ の両吸収極大は同じ程度に低下する。

3) HbO_2 の両吸収極大は正常人血液に比べて無「カ」血液症の血液では著明に低下する。

4) MetHb に一致する吸収極大は正常人血液で $630\text{m}\mu$ で僅かに認められる他は認め難い。しかし無「カ」血液症の血液では0.0005%の H_2O_2 の場合でも3日目に $630\text{m}\mu$ に明かに吸収極大を認め $500\text{m}\mu$ で吸収曲線が扁平化しているのが認められ、それらの傾向は時間の経過とともに一層著明となる。MetHb の吸収極大は最初に $630\text{m}\mu$ に認められ、次に $500\text{m}\mu$ に認められるようになる。

5) 無「カ」血液症の血液および正常人血液とも MetHb の蓄積をみ、更に時間とともに MetHb の濃度は増加する。

6) H_2O_2 の作用により蓄積された MetHb は正常人血液に比べ無「カ」血液症の血液では極めて高い。

7) 正常人血液において産生された MetHb は、本実験のごとく極めて低濃度の H_2O_2 の場合は、その濃度によつて大差はないが、無「カ」血液症の血液においては、その濃度により大差があり、濃度が高ければ産生された MetHb の濃度も高い。

以上のように無「カ」血液症の血液では、正常人血液に比較して、著明な MetHb 生成をみる。これらのことは宮本⁹⁾、折田²⁷⁾、河田²⁵⁾などの報告と考えあわせて、極めて低濃度の H_2O_2 を緩徐に、しかも持続的に無「カ」血液症の血液の HbO_2 に作用させた場合にも MetHb の生成があり、しかも時間とともに蓄積されるということに意義がある。

このことは宮本、高原が述べている無「カ」血液症患者の約半数に見られた進行性壊疽の増悪機転と

して、 HbO_2 の H_2O_2 による MetHb への変化によつて、組織への酸素供給不能によると説明していることと考えあわせて意味があると思われる。

第6節 結 論

「カ」活性の極めて低い無「カ」症患者の血液および「カ」活性の正常な正常人血液に、極めて低濃度の H_2O_2 を cellophane bag を用いて緩徐に、しかも持続的に作用させ、 5°C 、好氣的、無菌に保ち、 HbO_2 の H_2O_2 による分解によつて生ずると予想される変化を automatic recording Spectrophotometer (Beckman DK-2) を用いて、時間的に吸収スペクトルの面より客観的に追求し、とくに MetHb には注目して吸収曲線の追求をおこなうと同時に MetHb 濃度を Mills の方法により測定し、次の結果を得た。

1) 両血液の HbO_2 の $540\text{m}\mu$ および $578\text{m}\mu$ の両吸収極大は時間の経過とともに低下するが、正常人血液に比べて無「カ」血液症患者の血液で著明に低下した。

2) MetHb に一致する $500\text{m}\mu$ および $630\text{m}\mu$ の吸収極大は、正常人血液では僅かに認められる場合があるにすぎないが、無「カ」血液症患者の血液では著明に認められる。

3) 両血液とも MetHb の蓄積を認め、時間とともに MetHb 濃度は増加するが、正常人血液に比べ無「カ」血液症患者の血液では明らかに高濃度であった。

4) 無「カ」血液症患者血液においては H_2O_2 濃度が高いと MetHb 濃度も高いが、正常人血液では MetHb 濃度に差は認め難い。

5) これらの諸事実より、無「カ」血液症患者の血液の HbO_2 は正常人血液の HbO_2 に比べて H_2O_2 により容易に MetHb を形成する。宮本、高原は無「カ」血液症者に見られる特異な口腔疾患の発病機転として局所の組織細胞への酸素供給障害を挙げているが、上述の実験結果はそれを肯定するものである。

第3章 過酸化水素産生菌による無カタラス血液症患者血液および正常人血液における時間的变化およびメトヘモグロビンの蓄積

第1節 緒 言

前章では、無「カ」血液症患者の血液および正常人血液において、cellophane bag を使用して、 H_2O_2 を

各血液に緩徐に作用させて、その分解を吸収スペクトルの面より追求し、同時に MetHb 濃度を測定した。

本章では、第1章で用いた *Dp. pneum.*, *St. haem.*, *St. virid.* などの H_2O_2 産生菌を用い、前章と同様に無「カ」血液症患者の血液および正常人血液の HbO_2 におよぼす変化を automatic recording spectrophotometer (Beckman DK-2) を用いて時間的に吸収スペクトルの面より客観的に追求し、とくに MetHb に注目して吸収曲線の追求を行うと同時に MetHb 濃度も測定し、前章の cellophane bag を透して緩徐に H_2O_2 を作用させた場合とどのように異なるか、 HbO_2 の分解過程が異なるとすれば、その差違が吸収像の面にもあらわれはしないかと考えて次に述べるような実験を行い前章の実験成績と比較した。

第2節 実験材料

a) 供試細菌：第1章と同様に東大伝研より分与された *Dp. pneum.*, *St. haem.*, *St. virid.* の3株を用いた。

b) 供試血液：第2章と同様に中山家系の無「カ」血液症患者の血液を肘静脈より採血し、血液 5 cc にたいし heparin (1 cc 中に 1000 単位含有) 1 滴を加えこれを使用した。対照として「カ」活性の正常な正常人血液を同様に heparin を加えて用いた。

c) 血液加液体培地の作製：上記のごとく用意した各血液 0.5 cc をブイヨン 4.5 cc に混合して作製した。

第3節 実験方法

Dp. pneum., *St. haem.*, *St. virid.* の各々を血液寒天平板培地にて好氣的に純粋培養した後、前節のように作製した無「カ」血液症の血液或いは正常人の血液を加えた液体培地に各細菌を湿菌量にして 0.1/3mg 宛加え 37°C で好氣的に培養し、3日後、6日後に各々蒸溜水で10倍に稀釈溶血させた(全血の100倍に稀釈されている)後、8000 rpm 10分間3回遠沈をおこない、その上清について automatic recording spectrophotometer (Beckman DK-2) を用いて、MetHb 産生の度合をその吸収曲線により観察し、更に Mills の方法により MetHb 濃度を測定し全ヘム量にたいする百分率で表わした。なお本実験で MetHb とあるのは酸性 MetHb の意である。

なおこれらの対照として無「カ」血液および正常人血液の 10% 血液加液体培地を無菌的に 37°C で好氣的に保存した際の MetHb 産生の度合を Mills の方法で測定した。

第4節 実験成績

前節の方法にしたがって行なつた無「カ」血液症患者の血液および正常人血液に *Dp. pneum.*, *St. haem.*, *St. virid.* の各細菌の産生する H_2O_2 を作用させた場合の時間的経過による吸収像の変化および MetHb 濃度は Fig. 7~Fig. 12 および Table 5,

Fig. 7 *Diplococcus pneumoniae* 3 days

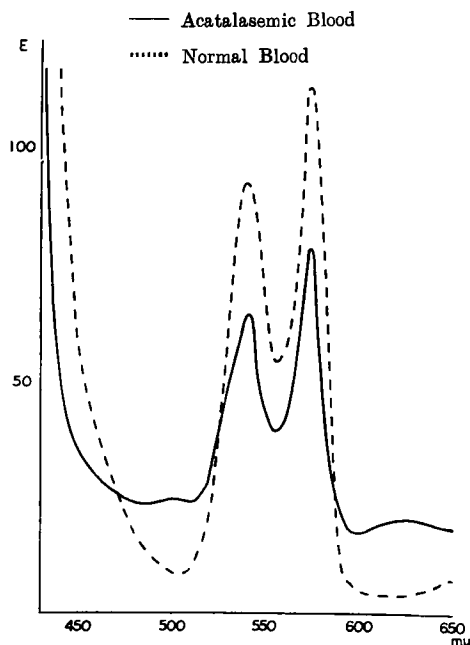


Fig. 8 *Diplococcus pneumoniae* 6 days

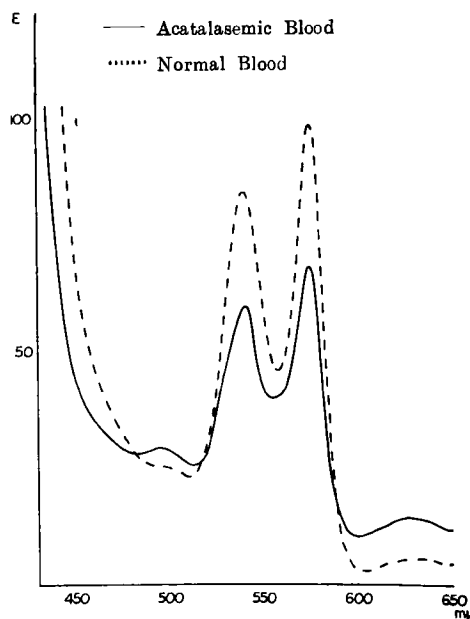


Fig. 9 Streptococcus haemolyticus 3 days

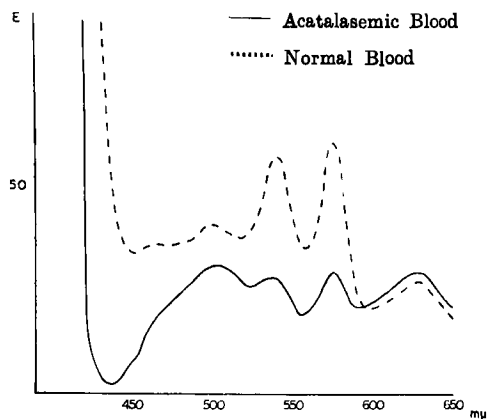


Fig. 10 Streptococcus haemolyticus 6 days

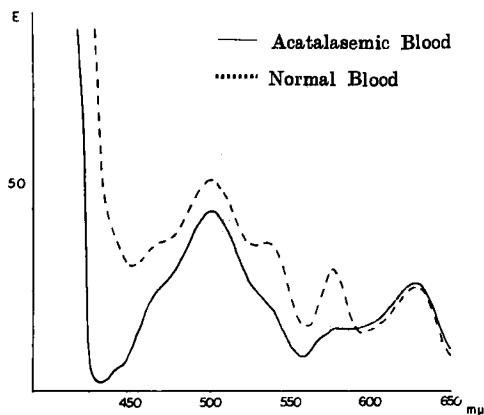


Fig. 11 Streptococcus viridans 3 days

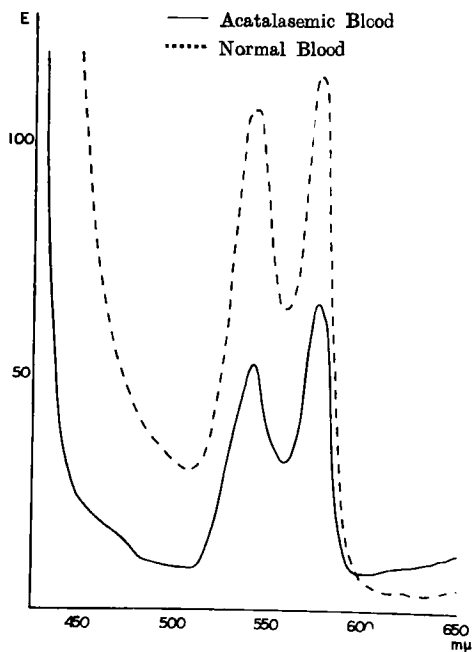


Fig. 12 Streptococcus viridans 6 days

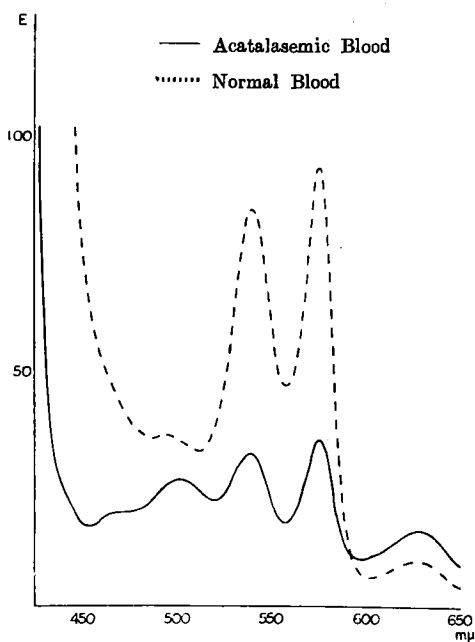


Table 5. metHb concentration in per cent of total heme compounds in acatalasemic blood

	metHb conc. (%)	
	3 d.	6 d.
Diplococcus pneumoniae (Type II)	25.1	76.6
Streptococcus haemolyticus	25.0	94.9
Streptococcus viridans	23.3	85.8

Table 6 に示すごとくである。また無菌的に放置したさいの無「カ」血液症患者の血液および正常人の血液の時間的経過による MetHb 濃度は Table 7 に

Table 6. metHb concentration in per cent of total heme compounds in normal human blood

	metHb conc. (%)	
	3 d.	6 d.
Diplococcus pneumoniae (Type II)	9.3	44.9
Streptococcus haemolyticus	9.8	47.5
Streptococcus viridans	6.3	53.6

示すごとくである。

A) 無「カ」血液症患者の血液の H_2O_2 産生菌による吸収像の変化および MetHb 濃度

Table 7. metHb concentration in per cent of total heme compounds in each blood without cocci

	metHb conc.(%)	
	3 d.	6 d.
Acatlasemic Blood	6.0	15.3
Normal Blood	4.3	11.8

a) *Dp. pneum.* の場合

Fig. 7 および Fig. 8 に示すごとく、HbO₂の両吸収極大は正常人血液のそれに比較し著明に低下しており、更に時間的経過とともに低下している。しかし酸性 MetHb に一致する 500 m μ および 630 m μ の吸収極大は 3 日後には明かに認められ、6 日後となると一層著明となる。MetHb 濃度は Table 5 のごとく 3 日後で 25.1%，6 日後で 76.6% であつた。なお溶血は肉眼的には認められない。

b) *St. haem.* の場合

Fig. 9, Fig. 10 に図示したごとく、540 m μ および 578 m μ の HbO₂ の吸収極大は 3 日後では正常人血液のそれと比較して著しく低下しているが、明かに吸収極大は認められる。6 日後となると両吸収極大は僅かに認められるのみである。MetHb の 500 m μ および 630 m μ の吸収極大は 3 日後で明瞭となり、6 日後には両吸収極大とも増大している。MetHb 濃度は Table 5 のごとく 3 日後で 25.0%，6 日後には 94.9% となつた。溶血は 3 日後には軽度に認められ 6 日後には高度に認められた。

c) *St. virid.* の場合

Fig. 11, Fig. 12 に図示するように、HbO₂ の両吸収極大は時間的経過とともに同程度に低下するが、6 日後にも明瞭に存在している。500 m μ 、630 m μ の MetHb 吸収極大は 3 日後に僅かに認められるが 6 日後にも認められ、*Dp. pneum.* のそれらよりも高く *St. haem.* のそれらよりも低い。MetHb 濃度は Table 5 のごとく 3 日後に 23.3%，6 日後に 85.8% であつた。肉眼的に溶血は認められなかつた。

B) 正常人血液の H₂O₂ 産生菌による吸収像の変化および MetHb 濃度a) *Dp. pneum.* の場合

Fig. 7 および Fig. 8 のごとく HbO₂ に特有な 540 m μ および 578 m μ に吸収極大が認められる。540 m μ および 578 m μ の両吸収極大は 6 日後では 3 日後に比べて低下している。酸性 MetHb に一致する 500 m μ および 630 m μ の吸収極大は 3 日後では認められないが、6 日後では 500 m μ で吸収曲線が扁平化し、

630 m μ では明らかに吸収極大が認められる。全ヘムに対する MetHb 濃度は Table 6 のごとく 3 日後で 9.3%，6 日後で 44.9% であつた。なお肉眼的には溶血は認められなかつた。

b) *St. haem.* の場合

Fig. 9 および Fig. 10 に示すごとく培養 3 日後で HbO₂ の両吸収極大は明らかに認められるがその低下は著しい。6 日後となると一層著明に低下している。MetHb に一致する 500 m μ 、630 m μ の吸収極大は 3 日後には認められ、6 日後となるとそれらの吸収極大は増大しているのが認められる。MetHb 濃度は Table 6 に示すごとく 3 日後で 9.8%，6 日後で 47.5% となつた。溶血は 3 日後に軽度認められ、6 日後には中等度認められた。

c) *St. virid.* の場合

Fig. 11 および Fig. 12 のごとく HbO₂ の吸収極大は明瞭に認められるが、時間的経過とともに低下している。3 日後では酸性 MetHb に一致する 500 m μ および 630 m μ の吸収極大は認められないが 6 日後には両吸収極大ともに明かに認められる。MetHb 濃度は Table 6 に示すごとく 3 日後で 6.3%，6 日後で 53.6% であつた。溶血は認めなかつた。

C) 無「カ」血液症患者血液および正常人血液の無菌的、37°C、好気的条件下での時間的経過による MetHb 濃度

Table 7 に示すごとく、正常人血液では 3 日後に 4.3%，6 日後に 11.8% の MetHb 濃度があり、無「カ」血液症患者の血液では 3 日後に 6.0%，6 日後には 15.3% の MetHb 産生をみた。

第 5 節 総括および考按

以上の実験成績を総括すると、

1) 両血液の HbO₂ に一致する 540 m μ および 578 m μ の吸収極大は時間の経過とともに低下しており、しかも両吸収極大は同程度に低下した。

2) HbO₂ の両吸収極大は、正常人血液に比べ無「カ」血液症患者の血液では著明に低下した。

3) MetHb に一致する 500 m μ および 630 m μ の吸収極大は、正常人血液に比べ無「カ」血液症血液では早期にしかも著明に認められ、時間の経過とともに一層顕著となる。またそれらの吸収極大は最初に 630 m μ に認められ、次いで 500 m μ に認められた。

4) 両血液とも MetHb の蓄積をみ、その濃度は各細菌の培養時間とともに増加したが、細菌の種類

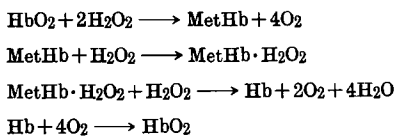
による MetHb 濃度には大差を認めなかつた。

5) 蓄積された MetHb 濃度は正常人血液に比べ無「カ」血液症患者では明らかに高濃度であつた。

6) 肉眼的な溶血は *St. haem.* を培養した血液で認められ、しかも正常人血液に比べ無「カ」血液症患者血液ではやや高度であつた。

7) 両血液を無菌的に放置した場合にも MetHb の蓄積をみ、しかも時間経過とともに増加する。MetHb 濃度は正常人血液に比べ無「カ」血液症患者血液では僅かに多い。しかし各細菌を培養した場合に比較すると極めて低濃度である。

Lavoisier により生体の酸化機構に関して研究がなされて以来、種々の研究がなされてきたが、正常細胞の呼吸代謝系の中で、どの程度の H_2O_2 が産生されており、その H_2O_2 をどの程度「カ」が利用乃至処理しているかも解明されていない。しかしある範囲内では「カ」は好氣的な生体において不可欠のもののように考えられてきた。ところが「カ」が先天的に欠損している体質異常者が発見され、しかも日常生活において一見正常者と異なることがないということは、この酵素が少なくとも生理的範囲では代謝系にあまり重要な意味をもたないものであらうと思われる。「カ」欠損（「カ」活性が極めて低い）の場合には正常細胞の呼吸代謝系で発生する H_2O_2 は MetHb と反応して処理されることが推定されている²³⁾。



(Keilin & Hartree による)

しかし生理的な代謝系とは別に、外因的に H_2O_2 が生理的範囲を越えた濃度に蓄積されるような場合にはおそらく「カ」以外には処理しえないと推定される。従つて細菌などにより代謝系外から供給され、生理的範囲を越えた濃度に蓄積された H_2O_2 はヘモグロビンに作用して MetHb を生成し、それが蓄積されると考えられる。

連鎖状球菌、肺炎双球菌に属する菌は一般に「カ」を全く保有していないか、またはごく僅かであるとされており、しかもこれらの菌は発育途次に H_2O_2 を産出すると藤田、児玉¹⁶⁾、Sevag 等³⁰⁾ は述べている。宮本⁹⁾、河田²⁵⁾ などはこれら H_2O_2 産生菌が無「カ」血液症患者の血液で MetHb を生成させることを報告しているし、更に河田はこれらの細菌の

H_2O_2 蓄積能と MetHb 生成能が平行関係にあることから MetHb がこれらの細菌によつて産生蓄積された H_2O_2 の作用によると推定している。本実験に用いた細菌はいずれもこれらに属する細菌であり、 H_2O_2 を産生すると考えられる。従つてこれら細菌が繁殖し、産生された H_2O_2 が生理的範囲を越えた濃度に蓄積され、ヘモグロビンに作用して MetHb が生成され蓄積されたと考えられる。

無「カ」血液症患者の中に見られる特異な口腔疾患の病因として、上代¹⁾、吉屋¹⁰⁾、向井¹¹⁾、竹久¹³⁾ 等は口腔内に棲息している H_2O_2 産生菌によつて産生された H_2O_2 が過剰な濃度に蓄積され、この H_2O_2 に強い親和性をもつ鉄系の化合物である呼吸酵素に作用し、当該組織細胞の呼吸酵素系に障害が起ることに主因を求めている。宮本、高原等は、本症の進行性壊疽の増悪機転として、細菌によつて産生され蓄積された H_2O_2 によつて、 HbO_2 が MetHb に変化することによつて組織細胞への酸素供給の障害に主因を求めている。

本実験の結果から考察すると、上代等の推論を否定することはできぬが、宮本、高原等の説のごとく H_2O_2 による HbO_2 から MetHb への変化が本症壊疽の一成因となりうると推測される。

第 6 節 結 論

Dp. pneum., *St. haem.*, *St. virid.* を無「カ」血液症患者血液あるいは正常人血液を加えた液体培地中に好氣的に培養し automatic recording spectrophotometer (Beckman DK-2) を使用して、時間的にその吸収スペクトルの面より HbO_2 の変化を客観的に追求し、特に MetHb 吸収峰には注目して観察するとともに MetHb 濃度を Mills の方法によつて測定し次の結果を得た。

1) 両血液の HbO_2 の吸収極大は細菌の培養時間とともに低下するが、無「カ」血液症患者の血液では正常人血液に比べて著明に低下した。

2) MetHb の吸収極大は両血液において認められ、時間の経過とともに増大するが、無「カ」血液症患者の血液では正常人血液に比べて早期にしかも著明に認められた。

3) 両血液とも MetHb の蓄積を認め、濃度は培養時間とともに増加するが、無「カ」血液症患者の血液では正常人血液に比べて明らかに高濃度であつた。

4) 肉眼的な溶血は、溶血性連鎖状球菌を培養し

た血液にのみ認められた。

5) 以上の如く無「カ」血液症患者の血液において正常人血液に比べて吸収スペクトルの変化および生成された MetHb の濃度に明らかな差異を認めることは、無「カ」血液症患者の血液が「カ」活性の極めて低いために菌の産生する H_2O_2 によつてもたらされたものと推定される。

稿を終わるに臨み、御懇篤な御助言、御校閲を賜わつた恩師 高原滋夫教授に深甚なる謝意を表します。又、直接御指導を賜わつた緒方正名教授に衷心より御礼申し上げますと共に適切なる御助言をいただいた上代皓三教授に心から謝意を表します。

本論文の要旨は第12回日本人類遺伝学会総会にて口演した。

主 要 文 献

- 1) 上代皓三：無カタラーゼ症，総合医学，12：915，1955.
- 2) 高原滋夫，他：血液「カタラーゼ」欠乏に因ると惟れる菌性進行性壊疽性顎骨炎の臨床的並びに実験的研究について，耳喉，21：53，1949.
- 3) Takahara, S.: Progressive Oral Gangrene Probably due to Lack of Catalase in the Blood, Lancet, Dec. 6: 1101, 1952.
- 4) Takahara, S.: Progressive Oral Gangrene due to Acatlasemia, Laryngoscope, 64: 685, 1954.
- 5) Takahara, S.: Acatlasemia (Lack of Catalase in Blood) and an Oral Progressive Gangrene, Proc. of Japan Acad., 27: 295, 1951.
- 6) Takahara, S.: Acatlasemia II. Contents of Catalase in Blood and Tissues of Men and Animals, Proc. of Japan Acad., 28: 383, 1952.
- 7) 高原滋夫：無カタラーゼ血液症並びに夫に因る新しい菌性口腔疾患について，公衆衛生，12：18，1952.
- 8) 高原滋夫：無カタラーゼ血液症並びに夫に因つてきたと惟える新疾患の提唱，岡山医学会誌，63：8，1951.
- 9) 宮本久雄：血液カタラーゼ欠除に因る菌性進行性壊疽性顎炎について，64：817，1952.
- 10) 吉屋勝：無カタラーゼ症について，口腔病，19：18，1952.
- 11) 向井建郎：無カタラーゼ症の歯肉部における組織壊死の成因について，日本口腔科学会雑誌，5：363，1956.
- 12) 土井勝三郎：無カタラーゼ血液症に出現する口腔壊疽についての実験的研究，岡山医学会誌，71：1125，1959.
- 13) 竹久 享：無カタラーゼ血液症に出現する高原氏病の成因について，岡山医学会誌，80：1968.
- 14) McLeod, J. W. and Gordon, J.: Production of hydrogen peroxide by bacteria, Bioch. J., 16：499，1922.
- 15) 三原 伸：無カタラーゼ血液症に於けるカタラーゼ量，ペルオキシダーゼ量，並びに家鴨，鷺鳥，鳩に於けるカタラーゼ量に就いて，岡山医学会誌，68：2185，1956.
- 16) 藤田秋治，児玉 威：病原細菌の Energie 発生反応に関する研究，細菌学雑誌，462：555，1934.
- 17) 緒方知三郎：病理組織顕微鏡標本の作り方手ほどき，南山堂，1964.
- 18) 高原滋夫，小倉義郎：無カタラーゼ血液症，診療，20：2262，1967.
- 19) 戸田忠雄：戸田新細菌学，南山堂，1957.
- 20) 浜崎幸雄，浜崎美景：病理組織標本の見方と鑑別診断の付け方，南山堂，1960.
- 21) 関 正次：組織学，杏林書院.
- 22) Fruton, J. S. and Simmonds, S.: General Biochemistry, John Wiley and Sons, inc. 1959.
- 23) Keilin, D. and Hartree, E. F.: Proc. Roy. Soc. London, B 119, 114, 1936; Biochem. J. 39: 293, 1945.
- 24) 高原滋夫：無カタラーゼ血液症ならびにそれに因る口腔疾患について，日本口腔科学会雑誌，15：83，1966.
- 25) 河田幹太郎：無カタラーゼ血液症患者血液に対する 2, 3 細菌の作用について，岡山医学会誌，70：905，1958.
- 26) Mills, G. C. and Randall, H. P.: Hemoglobin Catabolism, J. biol. Chem. 232: 589, 1963.
- 27) 折田洋造：無カタラーゼ血液症におけるヘモグロビンの分解について，人遺誌，7：163，1962.
- 28) 上代皓三，菊地吾郎，花岡知々夫：J. Biochem., 42: 423, 1955.
- 29) Fujita, A. unt Kodama, T.: Manometrische Bestimmung der Katalase, Bioch. Z., 232: 20, 1931.

- 30) Sevag, M. G.: *Bioch. Z.*, 267: 211, 1933. 解, 生化学, 24: 55, 1952.
- 31) 上代皓三, 中尾喜久: 血色素の生理と臨床, 医学書院, 1958. 34) Bingold, K.: *Zur Frage nach dem Schicksal des Haemoglobins im Organismus*, *Klin. Wochschr.*, 13: 1451, 1934.
- 32) 児玉 威: 猩紅熱毒素の研究, 細菌学雑誌, 467: 407, 1965. 35) 江上不二夫, 他: 標準生化学実験, 文光堂, 1953.
- 33) 菊地吾郎: 過酸化水素による Hemoglobin の分

Experimental Study on the Oral Gangrene Appearing in Takahara's Disease

Part II

Effect of a Few Cocci on the Acatalasemic Blood and Normal Blood

By

Yasuo MITANI

Department of Oto-Rhino-Laryngology Okayama University Medical School
(Director: Prof. Shigeo Takahara and Prof. Masana Ogata)

Résumé

As described in Part I, by injecting *Diplococcus pneumoniae* which generates hydrogen peroxide under the mucous membrane of the palate of duck, there appeared pathological changes in duck palate resembling macroscopically and microscopically the findings observed in acatalasemia cases. Being without definite conclusion on the point of action mechanism of hydrogen peroxide, it was assumed that the changes in duck palate were caused by hydrogen peroxide generated by the cocci.

To illustrate the point of action mechanism of hydrogen peroxide and the etiology of Takahara's disease the degradation of oxyhemoglobin and the methemoglobin-formation in culture of these cocci supplemented with duck blood, rabbit blood, acatalasemic blood or normal human blood were investigated by the following methods in each chapter.

Chapter I

The Investigation of the Methemoglobin-Formation in Duck Blood and Rabbit Blood

We conducted aerobic culture with the medium containing *Diplococcus pneumoniae* (Type II), *Streptococcus haemolyticus*, *Streptococcus viridans*, which were said to generate hydrogen peroxide and to have no catalase. This culture was supplemented with either duck blood or rabbit blood. Methemoglobin concentration in per cent of total heme compounds was tested by the method of Mills, G. C. at a fixed time. The results were as follows:

- 1) Methemoglobin-formation was observed in both blood and the longer the period of culture, the greater was methemoglobin deposit.
- 2) Methemoglobin deposit was greater with duck blood than with rabbit blood.

3) Hemolyzation was observed macroscopically only in the medium containing *Streptococcus haemolyticus* supplemented with either duck blood or rabbit blood. There was noticed not any difference in the methemoglobin concentration between hemolyzed blood and non-hemolyzed.

4) It was assumed that the differences in the methemoglobin concentrations of the two blood depend on the catalase activity potential of the two against hydrogen peroxide generated by the cocci.

Chapter II

Changes in the Oxyhemoglobin Absorption Bands and Measurement of Methemoglobin in Acatalasemic and Normal Human Blood

As hydrogen peroxide permeates cellophane sheet, we placed the cellophane bag containing various concentration of hydrogen peroxide into test tubes containing acatalasemic blood or normal human blood, and observed changes of oxyhemoglobin absorption bands by an automatic recording spectrophotometer (Beckman DK-2). Simultaneously methemoglobin concentration in per cent of total heme compounds was measured at certain intervals. The results were as follows.

1) It was observed that in acatalasemic blood the lowering of the peaks (absorption maximum) at $540_{m\mu}$ and $578_{m\mu}$ appeared more rapidly than in normal human blood.

2) The methemoglobin absorption bands at $500_{m\mu}$ and $630_{m\mu}$ were observed markedly in acatalasemic blood, while in normal human blood were hardly noticed.

3) Deposit of methemoglobin was observed in either acatalasemic blood or normal human blood, and the longer the period of permeation of hydrogen peroxide, the higher was the concentration of methemoglobin, and in the former blood methemoglobin concentration was markedly high in contrast to that in the latter.

4) It was assumed that the differences of the methemoglobin concentration and differences of the changes of the oxyhemoglobin and methemoglobin absorption bands between the two bloods were brought about by the potential difference of catalase activity.

Chapter III

Changes of the Oxyhemoglobin and Methemoglobin Absorption Bands in the Culture of Cocci generating Hydrogen Peroxide using Bouillon supplemented with Acatalasemic Blood or Normal Human Blood

After conducting aerobic culture of *Diplococcus pneumoniae*, *Streptococcus haemolyticus*, or *Streptococcus viridans* in bouillon supplemented with acatalasemic blood or normal human blood, the investigation was carried out on the changes of the oxyhemoglobin and methemoglobin absorption bands using an automatic recording spectrophotometer (Beckman DK-2), and the quantitative methemoglobin determinations in acatalasemic blood as well as in normal human blood were done. And the following results were obtained.

1) The lowering of the peaks (absorption maximum) at $540_{m\mu}$ and $578_{m\mu}$ was noted in both acatalasemic blood and normal human blood. In the former blood the lowering of the peaks was more marked than in the latter.

2) The methemoglobin absorption bands at $500_{m\mu}$ and $630_{m\mu}$ were observed more markedly in acatalasemic blood than in normal human blood.

3) Deposit of methemoglobin was seen in both acatalasemic blood and normal human blood, and according to the length of the culture time the methemoglobin concentration became higher in both blood. In acatalasemic blood the methemoglobin concentration was markedly high compared with that in normal human blood.

4) It was assumed that the differences of the changes of the oxyhemoglobin and methemoglobin absorption bands and the differences of the methemoglobin concentration between both blood were brought by the potential difference of catalase activity.

5) From these results it seems to be one of the etiologies of Takahara's disease that the degradation of oxyhemoglobin and the methemoglobin-formation caused by hydrogen peroxide generated by these cocci provoke oxygen deficiency for cells or tissues.
