

無カタラーゼ血症に関する研究

第 一 編

過ホウ素酸ナトリウムを用いた低カタラーゼ血症の新しいスクリーニング法について、とくに自動酵素反応装置の製作について

岡山大学医学部公衆衛生学教室（主任：緒方正名教授）

大学院生 松 田 誠 一

（昭和56年12月18日受稿）

Key words: acatalasemia,
perborate, screening,
semi-automatic

緒 言

無カタラーゼ血症は、1947年高原らによって報告された。本症は、常染色体上の劣性遺伝子の同型接合の状態、血液中のカタラーゼ活性値が正常者の約 $\frac{1}{500}$ を呈し、その半数は顎骨壊死を生じる体質異常者である。本遺伝子の異型接合体は、低カタラーゼ血症とされ、その血中カタラーゼ活性値は、正常者の約半分以下とされる¹⁾⁻⁵⁾。従って低カタラーゼ血症を発見することは、無カタラーゼ血症の gene flow を知り、人類の変動を予測し、又、無カタラーゼ血症の発見を未然に防ぐ意味で、公衆衛生学上及び人類遺伝学上重要である。この点に関して、現在までに興味のある報告がある^{6),7)}。

現在までに考案されたヒトの低カタラーゼ血症のスクリーニング法としては、過酸化水素を基質として過マンガン酸カリで判定する方法（以下、過酸化水素法⁸⁾、紫外吸収法⁹⁾、フローティングディスク法¹⁰⁾、ポーラログラフイー法¹¹⁾、テストテープを用いる方法¹²⁾等があるが現在までに主として用いられたのは、過酸化水素法である。しかし、過酸化水素は、保存に困難で、また、調整后直ちに使用しなければならないと云う欠点がある。

一方に於て、同型接合体である無カタラーゼ血症マウスの血液カタラーゼの検索については

Feinstein の方法がある¹³⁾。これは、過ホウ素酸ナトリウムを基質とする肝、脾、腎等のカタラーゼの定量法¹⁴⁾（以下、過ホウ素酸ナトリウム法）を基礎とするものである。この定量法はその後、松原¹⁵⁾らによって定式化されている。過ホウ素酸ナトリウムは基質として直ちに調整し易い利点があり、過酸化水素に比し安定である。

今回、筆者は、この Feinstein の方法を人に適用し、更に従来方法にみられる用手法の繁雑さを軽減する為に反応系の大部分を自動化し、迅速かつ正確な操作が可能な様に改良した。この様にして、不完全優性又は劣性遺伝の形式をとる遺伝子病の異型接合体、すなわち低カタラーゼ血症の新しいスクリーニング法を考案したのでここに報告する。

実験材料と実験方法

A. 反応液の調整

松原ら¹⁵⁾の定量法に準拠し、以下の試薬を作成した。試薬は全て特級を用いた。

1) 過ホウ素酸ナトリウム (NaBO₃) 溶液
1.5% NaBO₃·4H₂O 溶液に濃塩酸を加え pH 6.8 とした。

2) リン酸緩衝液 (phosphate buffer)

第一リン酸カリと第二リン酸ソーダを 6 : 4 の割合で加え、 $\frac{1}{15}$ N とした。pH は 6.8 である。

3) 基質溶液

上記1)の過ホウ素酸ナトリウム溶液と2)のリン酸緩衝液を32:6の割合で混和し、基質溶液とした。

4) 2 N 硫酸 (H_2SO_4)

5) $\frac{1}{20}$ N 過マンガン酸カリ ($KMnO_4$) 溶液

6) 稀釈溶血液

血液は、成人肘静脈より採血しヘパリン化して4℃に保存した。この血液の稀釈には今回特に、Drumond®社のマイクロディスペンサーを用い、全血20 μ lを10mlの蒸留水に、即ち500倍に稀釈し同時に溶血せしめた。なお、高度稀釈溶血液のカタラーゼ活性は、氷冷下でも不活化される速度が大きいので、なるべく測定直前に水稀釈溶血せしめた。

B. 実験装置

図1. は、筆者が考案した低カタラーゼ血症

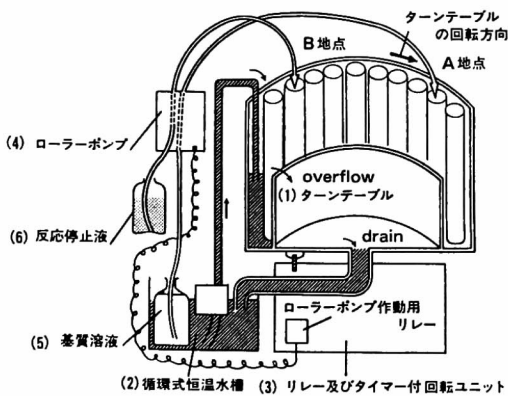


図1. 試作機の原理及び模型図

の自動的スクリーニングの為の装置（試作機）の原理及び模型図である。本図に示す如く、NE社の50ml大型試験管は(1)のターンテーブルの中に挿入されている。この試験管はテーブルに付属した(2)の循環式恒温水槽により37℃に保たれている。ターンテーブルは、その下に設置された本図の(3)のタイマー及びリレー付回転ユニットで試験管1本分ずつ回転していく。すなわち、まずタイマーが7.8秒間作動し、この間に(3)の回転ユニットが(1)のターンテーブルを試験管1本分の角度（本試作機では15°）だけ本図の如く時計方向に回転させる。次に、あらかじめリレー（0.0秒より99.9秒まで可変）を作動時間

10.0秒に設定してあるところの、本図中(3)の回転ユニットに内蔵されたリレーが、10.0秒作動する。このリレーは、注入用チューブに Taignon®社のR3603を用いた、本図(4)のFURUE SCIENCE®社のローラーポンプに接続されていて、リレー作動開始と共にポンプの電源が入り、作動終了と共に電源が切れる様制御する。このリレー作動時間10.0秒間に、ローラーポンプの先端より、A地点で基質溶液が、B地点で反応停止液（2N硫酸）が、各々3.8mlずつ、同時に、注入される。このリレー作動時間10.0秒間はターンテーブルは静止している。

従って、上記の場合、試験管1本分の回転に要する時間はタイマー作動時間7.8秒にリレー作動時間10.0秒を加えた17.8秒である。それ故、試験管の本数を18本とすると、各試験管は、試験管17本分の角度に相当する時間だけ回転することになり、各試験管は、17.8秒 \times 17、すなわち303秒かかってA地点よりB地点まで移動する。これは、全体の反応時間を5分とする松原ら¹⁵⁾の定量法にほぼ相当する。また、18本の試験管全ての反応過程が終了する時間、即ち、ターンテーブルが本反応の為に一周する全体の時間は、最後の試験管がA地点に到達した時、最初の試験管がB地点に来ているので、試験管が18本 \times 2=2本、即ち、34本分回転するのに要する時間であり、17.8 \times 34=605秒、すなわち、約10分余りである。

図2は実験装置の実景である。

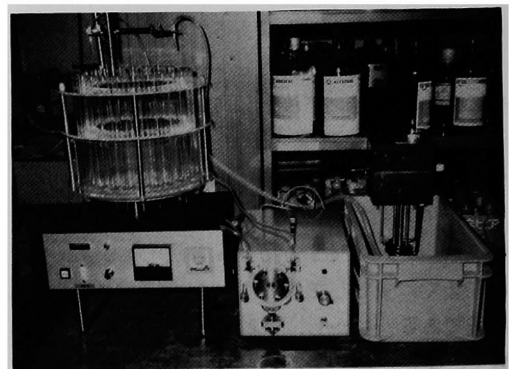


図2. 実験装置の実景

C. 操作法

まず、あらかじめ、各試験管18本に0.2mlの

稀釈溶血液を入れておく、ターンテーブルは、1回の回転で17.8秒ずつかかって15°回転して行きA地点で10秒間かかって、図1の(5)で37°Cに保たれた基質溶液3.8mlが注入される。尚、こうして、最初の試験管がB地点に到達するまでの5分間(正確には303秒)は、B地点で注入すべき反応停止液(即ち、2N硫酸)は、図1の(6)に示した試薬びんに再回収させるべく、ローラーポンプの先端をB地点からはずしておき、毎回注入されるべき3.8mlの2N硫酸をすべて図1の(6)の試薬びんに回収させる。

さて最初の試験管がB地点まで到達するとローラーポンプの先端をB地点にもどしここで、各試験管に3.8mlずつ図1の(6)の反応停止液、すなわち2N硫酸を注入する。

こうして反応の終了した試験管をターンテーブルよりとり出し、一定量の $\frac{1}{20}$ N過マンガン酸カリを加え、その退色の有無より正常と低カタラーゼ血症とを判別する。

実験結果

1) マイクロディスペンサーを用いた血液稀釈の精度

従来血液の稀釈にはメランジュールが用いられて来たが、より迅速に一定量の血液を定量稀釈する方法として筆者は今回新たに Drumond®社のマイクロディスペンサーを使用した。この際血液の粘性によると思われる誤差を500倍稀釈後のヘモグロビン濃度を指標として求めた。ヘモグロビン濃度は540nmにおける吸光度より求めた。表1に示す如くばらつきは充分に小さく実用に耐え得ると考えられる。

2) ポンプ注入量の精度

ローラーポンプには、比較的容量の大きな FURUE SCIENCE®社の Model RP-Vを用いたが注入精度は、±2%程度であった。これは実用に充分耐え得ると考える。

3) 判別限界値の決定

このスクリーニング法に於て最後に判定用として加える過マンガン酸カリの量は、従来行なわれて来た過酸化水素法による正常及び低カタラーゼ血症、無カタラーゼ血症のカタラーゼ活性の測定値と、過ホウ素酸ナトリウム法でのそ

表1. 正常人3例の血液をマイクロディスペンサーで20 μ lとり、蒸留水10mlで稀釈した場合のヘモグロビン濃度のばらつき(各検体につき10回測定)

	A	B	C
n	10	10	10
m	0.2295	0.2340	0.1629
σ	0.00585	0.00725	0.00344
σ/m	2.549	3.098	2.112

n: 稀釈検体数

m: OD_{540nm}における吸光度の平均値

σ : 標準偏差

σ/m : 変動系数

れとの間に回帰式をつくり、緒方ら⁵⁾の過酸化水素法による判別限界値を代入し、過ホウ素酸法による判別限界値を求め、これから所要過マンガン酸カリの量を算出した。

①. まず、正常者17名、低カタラーゼ血症1名、及び無カタラーゼ血症1名について、同時に過酸化水素法及び過ホウ素酸ナトリウム法にて測定を行なった。その結果を表2及び図1に示す。

②. 次に過酸化水素法と過ホウ素酸ナトリウム法との相関を求めたところ次の回帰式が得られた。

$$y = 608.91x + 80.64 \quad r = 0.95$$

ここでyは、PU/gHbで過ホウ素酸ナトリウム法での測定値(ヘモグロビン補正值)を示し、xは、Kcatで過酸化水素法での測定値(ヘモグロビン補正值)を示す。rは相関係数を示す。尚、t検定を行なったところ、有意水準0.01で有意であることが証明された。すなわち、両側t検定にて、

$$t = \frac{0.95}{\sqrt{1 - (0.95)^2}} \times \sqrt{19 - 2}$$

$$= 12.54 > t_{0.01}(19 - 2) = 2.898$$

であった。

この回帰式に緒方ら⁵⁾の過酸化水素法による、正常者と低カタラーゼ血症者との判別限界値 Kcat = 3.29 すると、

$$y = 608.91 \times 3.29 + 80.64$$

となり、過ホウ素酸ナトリウム法での判別限界

値2083 PU/gHbが得られた。

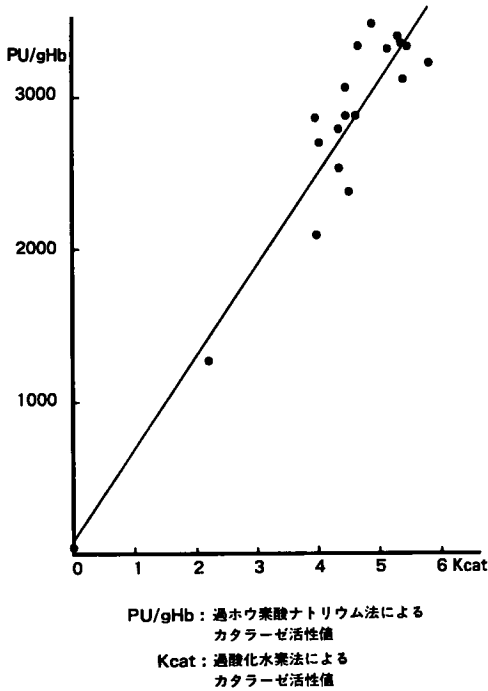


図3. 過酸化水素法と過ホウ素酸ナトリウム法でのカタラーゼ活性値の相関

③. 更に、過ホウ素酸ナトリウム法におけるカタラーゼ活性値 PU/gHb は、松原ら¹⁵⁾により次式により与えられると定義されている。

$$[PU/gHb] = \frac{0.05 \times f \times (c - x) \times e \times t}{\frac{Hb}{100}}$$

ここで、c はコントロール、すなわち、蒸留水0.2ml を稀釈血液の代りに用いた場合の $\frac{1}{20}N$ 過マンガン酸カリの滴定量であり筆者の側定では12.29 を得ている。次に、x は被検血液を用いた場合に、滴定に要する $\frac{1}{20}N$ 過マンガン酸カリの量である。f は力価系数でほぼ1である。e は、酵素液すなわち稀釈溶血液を1mlに換算する為に、すなわち、1ml ÷ 0.2ml で求めた数値5、t は稀釈倍数である。Hb は被検血液のヘモグロビン値であるが、筆者は平均値として15.0 g/dl を用いた。この式に⑥で求めた判別限界値 2083 PU/g/gHb を代入すると、

$$2083 = \frac{0.05 \times 1 \times (12.29 - x) \times 5 \times 500}{\frac{15.0}{100}}$$

従って x=9.79 を得る。

これが、判別点に対応する $\frac{1}{20}N$ 過マンガン酸カリの量である。ここで、試薬の加え易さを考慮して、最終的に加えるべき過マンガン酸カリの量を10.0ml とした。

4) 試作機を用いた判別の実際

3)で求めた過マンガン酸カリの量で表2の如く十分に判別される筈であるが、ここでは実際に試作機を用いての判別を行なった。一般に低カタラーゼ血症者はその血液カタラーゼ活性値

表2. 過酸化水素法及び過ホウ素酸ナトリウム法による人血液カタラーゼ活性値の測定

検体番号	$\frac{1}{20}N$ KMnO ₄	Hb	PU/gHb	Kcat
N. 1	8.20	15.9	3215	5.78
2	8.59	13.9	3327	4.67
3	8.34	14.2	3477	4.87
4	8.52	14.1	3342	5.34
5	7.95	16.8	3229	5.44
6	7.87	17.7	3121	5.35
7	9.51	13.7	2536	4.34
8	7.33	18.4	3370	5.27
9	8.93	15.1	2781	4.31
10	8.35	14.9	3305	5.12
11	9.18	14.4	2700	4.03
12	9.66	15.7	2094	3.95
13	8.72	15.5	2879	4.64
14	9.28	15.8	2381	4.49
15	9.10	13.9	2869	4.45
16	8.75	14.5	3052	4.41
17	9.12	13.9	2851	3.95
H. 18	10.82	14.5	1267	2.20
A. 19	12.25	13.0	38	0.00

KMnO₄: 過ホウ素酸ナトリウム法で実際に要した、 $\frac{1}{20}N$ 過マンガン酸カリの滴定量 (ml)

Hb: ヘモグロビン値 (g/dl)

PU/gHb: 過ホウ素酸ナトリウム法による1gヘモグロビンあたりのカタラーゼ活性値

Kcat: 過酸化水素法によるヘモグロビン補正後のカタラーゼ活性値

が正常者の $\frac{1}{2}$ 以下を示すので、ここでは、一例の低カタラーゼ血症者の他に、5例の正常者の血液の500倍及び1000倍稀釈溶血液をつくり、1000倍のものを低カタラーゼ血症とみだてて判別を行なったところ、表3の如く正常者の500倍稀釈液には、全て過マンガン酸カリの色調が残り「正常者」と判定され、また1例の低カタラーゼ血症者及び1000倍稀釈液は全て過マンガン酸カリの色調が消失し、「低カタラーゼ血症」と判定された。尚、同時に試作機で反応させた

あと滴定に要した過マンガン酸カリの量は、表3の如くで、判別の妥当性を証明し得た。

表3. 正常人5例および低カタラーゼ血症者1例につき試作機使用による過ホウ素酸ナトリウム法での500倍及び1000倍稀釈血液に対する所要 $\frac{1}{20}$ N過マンガン酸カリ滴定量(ml)及びスクリーニングの結果

検体番号	500倍		1000倍	
N1	8.64	-	10.68	+
2	8.82	-	10.40	+
3	9.12	-	10.47	+
4	7.26	-	10.24	+
5	7.93	-	10.41	+
H6	10.86	+		

-は、正常と判定されたもの
+は、低カタラーゼ血症と判定されたもの

考 案

現在までに行なわれて来た手法による人の低カタラーゼ血症のスクリーニング法に対して、正確かつ人手を要しない自動酵素反応装置(試作機)によるスクリーニング法を考案した。基質としては、過ホウ素酸ナトリウムを用いた。過ホウ素酸ナトリウムは、基質として安定かつ正確であるが、基質酵素反応系の操作にやや時間がかかるきらいがあった。そこで、この反応系の大部分を自動化し、約10分間で、18検体の処理ができる様考案した。判別の成績は良好で、スクリーニング法としては優れた方法であると考えられる。

判別限界点については、緒方ら⁵⁾の成績をもとにして算出したものであるが、最後に加える過マンガン酸カリの量は、低カタラーゼ血症のとりこぼしを少なくする為にも、又、注入の便宜上からも、算出値よりもやや多めの10mlとした。このことについては、ヘモグロビン値補正がこのスクリーニングに適用されていないこと等とも関連して、今後検討を要するものと思われる。

次に、本試作機のローラーポンプは1台で基質溶液及び反応停止液を注入する様に設計したが、更に、もう一台のローラーポンプを接続し、基質溶液と反応停止液を別々に注入する形式にするとより操作が簡易となると考えられる。

最後に、本法は、非常に正確かつ能率的に低カタラーゼ血症のスクリーニングを行なえると云う観点から、無カタラーゼ血症の gene flow の把握、及びその発生の予防と云う、人類遺伝学及び公衆衛生学的見地からして、これに大きく寄与するものと考えられる。

結 論

基質として過酸化水素に比し調整が容易で安定な過ホウ素酸ナトリウムを用い、しかも反応系の一部を機械化し半自動的に正常及び低カタラーゼ血症者間のスクリーニングのできる方法を考案し次の結果を得た。

1. 自験例19例につき過酸化水素法(単位はKcat)と過ホウ素酸ナトリウム法(単位はPU/gHb)との間に次の回帰式を設定した。

$$y = 608.91x + 80.64 \quad r = 0.95$$

ここでyはPU/gHb値、xはKcat値rは相関係数であり、有意水準0.01で有意である。

2. この回帰式に緒方らの判別限界値を代入し、過ホウ素酸ナトリウム法での判別限界値を得、これに対応する $\frac{1}{20}$ N過マンガン酸カリの量を算出した。この値は実際の判別に有効であった。

3. 反応系は試作の回転式恒温水槽を用いて自動化し、約10分間に18検体の処理が可能であった。

4. 判定困難な境界値を示す例に対しては上記試作機で反応させ過マンガン酸カリを用いて滴定し定量することができる。

稿を終えるに当り、ご指導とご校閲を賜った恩師緒方正名教授に深く謝意を表します。

文 献

1. 高原滋夫, 宮本久雄: 家族的に見られたる歯性壊疽性顎骨炎の3例, 日耳鼻, **51**, 163—164, 1948.
2. Takahara, S.: Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood (Acatlasemia) *Lancet* **2**, 1101—1104, 1952.
3. 高原滋夫: 無カタラーゼ血症. 人遺誌, **7**, 37—59, 1962.
4. 緒方正名, 高原滋夫: 血球にふくまれたる酵素蛋白質成分の遺伝生化学的研究法. 医化学実験法講座, 第5巻 B pp. 291—320, 1974.
5. Ogata, M., Tomokuni, K., Watanabe, S., Osaki, H., Sadamoto, M. and Takahara, S.: Residual catalase in the blood of Japanese acatalasemia. *Tohoku J. Exp. Med.* **107**, 105—114, 1974.
6. Takahara, S., Hamilton, H. B., Neel, J. V., Kobara T. Y., Ogura, Y. and Nishimura, E. Y.: Hypocatalasemia: A new genetic carrier state. *J. Clin. Invest.* **39**, 610—619, 1960.
7. Ogata, M., Hayashi, S. and Takahara, S.: Estimation of the frequency of the recessive gene of acatalasemia in Japan. *Acta Med. Okayama* **25**, 193—198, 1971.
8. Hamilton, H. V., Neel, J. V., Kobara, T. Y. and Ozaki, K.: The frequency in Japan of carriers of the rare recessive gene causing acatalasemia. *J. Clin. Invest.* **40**, 2199—2208, 1961.
9. 中川嘉人: 分光光度法による人血液カタラーゼ活性の定量および低カタラーゼ血液症のスクリーニング法について. 岡山医誌, **80**, 616—635, 1968.
10. 高越良明: 低カタラーゼ血液症の簡易検出法に関する研究. 岡山医誌, **88**, 53—58, 1974.
11. 住田昭三: 隔膜型ポーログラフ電極による人血液カタラーゼの定量的スクリーニング法について. 岡山医誌, **88**, 53—58, 1974.
12. 大倉興司, 沼田宣雄, 阿南功一: 血液カタラーゼのスクリーニングとしての簡易検出法. 人遺誌, **13**, 208—215, 1968.
13. Feinstein, R. N.: A rapid blood catalase screening technique adjustable to any level of activity. *Anal. Biochem.* **8**, 277—281, 1964.
14. Feinstein, R. N.: Perborate as substrate in a new assay of catalase. *J. Biol. Chem.* **180**, 1197—1202, 1949.
15. Matsubara, S., Suter, H. and Aebi, H.: Fractionation of erythrocyte catalase from normal, hypocatalasemic and acatalasemic humans. *Humangenetik* **4**, 29—41, 1967.

Studies on acatalasemia

Part 1. An advanced screening method for hypocatalasemia, using perborate as substrate, with special reference to an experimental -semiautomatic- device.

Seiichi MATSUDA

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama, Japan.

(Director: Prof. M. Ogata)

An advanced screening method of hypocatalasemia was designed, using (1) perborate as substrate (perborate method) which is stabler and easier to prepare than hydrogen peroxide (H_2O_2) as substrate (H_2O_2 method), and (2) an experimental device which makes the reaction procedure semi-automatic. The following results were obtained;

1. Regression equation was established between the catalase activities measured by perborate method and those of H_2O_2 method.
2. Discriminant point was calculated from this equation with the discriminant value by H_2O_2 method established by Ogata et al. The volume of potassium permanganate to be added for the final discrimination, thereby, was calculated.
3. The reaction procedure could be made semi-automatic by an experimental device which consists of a circulating water-bath and a rotary type fraction collector. Eighteen specimens could be examined in about 10 minutes.
4. In borderline cases quantitative analysis is immediately available with this device.