

タカラゼの生合成に関する実験的研究

岡山大学医学部耳鼻咽喉科学教室（主任：高原滋夫教授）

森 田 善 雄

〔昭和48年9月19日受稿〕

目 次

第1章 緒 論

第2章 モルモットのカタラーゼへの ^{59}Fe incorporation に関する実験

第1節 緒 言

第2節 実験材料および実験方法

第3節 実 験 成 績

第4節 小括ならびに考按

第5節 結 語

第3章 家兎のカタラーゼへの ^{59}Fe incorporation に関する実験

第1節 緒 言

第2節 実験材料および実験方法

第3節 実 験 成 績

第1項 カタラーゼに関する実験成績

第2項 Starch block electrophoresis に関する実験成績

第4節 小括ならびに考按

第5節 結 語

第4章 X線照射によるマウスのカタラーゼ活性度の変動に関する実験

第1節 緒 言

第2節 実験材料ならびに実験方法

第3節 実 験 成 績

第4節 小括ならびに考按

第5節 結 語

第5章 全章の総括ならびに考按

第6章 結 論

第1章 緒 論

Acatlasemia は1949年、高原¹⁾により初めて記載された先天性酵素異常症である。本症はその名の示すごとく血液のカタラーゼ欠損症であるが、その他の臓器、組織について高原ら²⁾³⁾は口腔、鼻腔、副鼻腔各粘膜における酵素活性の欠損を証明し、上代ら⁴⁾⁵⁾は肝臓、筋肉、骨髓、血液のカタラーゼの欠損を認めた。しかし、現在まで完全な剖検例がないため、本症が果して全身的なカタラーゼ欠損症であるか否かは今なお不明である。

本症の発見はカタラーゼの生理機能、代謝、生合成などに関して重要かつ広汎な問題を提起した。これに関して、カタラーゼが生体内のいずれの臓器で作られるかという点についても明らかにされていない。カタラーゼは動植物体に広く存在し、哺乳類では赤血球と肝臓において酵素活性が特に高いことから Bonnischen⁶⁾は馬の赤血球および肝臓カタラーゼの化学的、免疫学的性質を比較し、両者は全く同一起源のもので推定した。一方 Theorell ら⁷⁾は⁵⁹Feを用いた動物実験の結果、これを否定している。また肝臓カタラーゼと血液カタラーゼは性質がやや異なるという報告もある⁸⁾。それで血液および肝臓カタラーゼは別個の起源をもち、血液カタラーゼの起源を骨髓に求めるのが妥当と考えられている。

この点の解明のため、著者は⁵⁹Feを用いて、その血液および肝臓カタラーゼへの incorporation について追求すると同時に、骨髓カタラーゼへの⁵⁹Fe incorporation についても観察した。また、これらカタラーゼへの⁵⁹Fe incorporation を確かめるために電気泳動によるカタラーゼの分離を行なった。血液カタラーゼの骨髓由来に関しては、さらに放射線照射による血液および肝臓カタラーゼの酵素活性の変動を比較検討して両者の関係について考察を加えた。以下、その結果について述べる。

第2章 モルモットのカタラーゼへの

⁵⁹Fe incorporation に関する実験

第1節 緒 言

血液カタラーゼと肝臓カタラーゼの起源の相異に関して⁵⁹Feを用い Theorell ら⁷⁾と同様の実験を行なうとともに、骨髓カタラーゼへの⁵⁹Fe incorporation の観察および赤血球における⁵⁹Fe incorporation について検討を行なった。

第2節 実験材料および実験方法

1. 実験動物および実験材料

500gm前後の健康なモルモット16匹を使用した。放射性同位元素はOak Ridge National Laboratory製の⁵⁹FeCl₃塩酸溶液を用いた。

2. 放射性同位元素の注射

⁵⁹FeCl₃溶液を適宜、希釈したものを、体重100gm当り5 μ c (micro-curie)の割合でモルモットの腹腔中へ1回に注射した。注射量は半減期表より算出した。実験期間中の放射能減衰は動物に注射した⁵⁹FeCl₃溶液の一部を濾紙円板に滲ませたものをstandard discとして保存し、その放射能の減衰を実験開始時の放射能と比較補正した。

3. 実験試料の調整方法

⁵⁹Fe注射後、2, 5, 9, 15, 21, 28, 48, 56日の各日にモルモットを2匹づつ屠殺、実験に供した。まず、心臓を穿刺して少量のヘパリン液を注射したのち開胸し、心切開して採血する。さらに流出した血液を吸引採取後、大動脈にポリエチレン管を挿入、生理食塩水で灌流し血液を集めると同時に、他臓器の血液残留による影響を防いだ。そのあと肝臓の摘出、長管骨の採集を行なった。

血液カタラーゼの調製*

心臓切開により採取した全血および灌流により得た血液を合せて遠沈し、血漿および白血球を捨てて得られた血球泥を生理食塩水で3回洗滌する。これに2倍量の蒸留水を加えて溶血させ、氷室に一夜保存したのち0.3倍量の永冷エタノール・クロロフォルム(以下Et-OH·CHCl₃と略す)(3:1)を攪拌しながら徐々に加え、生ずる沈澱を遠沈除去、上清を濾過後アラビヤゴム溶液に透析、濃縮してカタラーゼ溶液を得た。

肝臓カタラーゼの調製*

摘出肝臓をよく水洗し、索状成分を除いたのち、2倍重量の蒸留水を加えてミキサーで永冷しつつhomogenateとする。これに0.3倍量のEt-OH·CHCl₃(5:1)を加え、生ずる沈澱を遠沈除去、上清に純エタノールを加えて60%濃度とし、生ずる沈澱を少量の蒸留水に溶解し、氷室内で蒸留水に一夜透析して肝臓カタラーゼ溶液を得た。

骨髓カタラーゼの調製

長管骨を割って骨髓を取り出し、肝臓と同じ方法

* Theorell ら⁷⁾の方法の一部を準用した

で homogenate とする。これに0.5倍量前後の Et-OH·CHCl₃ (3:1) を加えてカタラーゼを抽出した。上清を濾過後アラビヤゴム溶液により濃縮、骨髓カタラーゼ溶液を得た。

これらカタラーゼ溶液には分光光学的にヘモグロビンの最大吸収帯 (540m μ , 578m μ) の認められないことを確認した。

4. ヘモグロビン量の測定

ヘモグロビン量 (以下 Hb と略す) はヘモグロビン計 (Coleman 25 Photo-hemoglobinometer) を用いて測定した。

5. 放射能の測定

神戸工業製ウエル型シンチレーションカウンターを用いて⁵⁹Feの γ 線量を測定した。すなわち試料各2.0mlについて、カタラーゼ溶液では10分間、溶血液では2分間の放射能を測定した。自然計数は30分間測定した。放射能測定の標準偏差は次式に従って算出した⁹⁾

$$\sigma^2 = \frac{n_s}{t_s} + \frac{n_b}{t_b}$$

$$n \pm \sigma = (n_s - n_b) \pm \sqrt{\frac{n_s}{t_s} + \frac{n_b}{t_b}}$$

σ = 標準偏差

n = 試料の単位時間の正味の計数

n_s = 試料の単位時間の計数

n_b = 自然計数の単位時間の計数

t_s = 試料の測定時間

t_b = 自然計数の測定時間

6. カタラーゼ活性度の測定

von Euler-Josephson¹⁴⁾ 法の変法で、現在岡山大学耳鼻科教室で用いている方法¹⁵⁾ により各カタラーゼの K cat を測定した。

第3節 実験成績

カタラーゼに関する実験成績は表1及び図1に示した。血液カタラーゼにおける⁵⁹Fe incorporation curve は漸増の傾向を示し、肝臓カタラーゼにおける⁵⁹Fe incorporation curve は⁵⁹Fe注射後5日目に最大値に達して以後は減少する。この両曲線の相異は、この二つのカタラーゼが別個の起源であることを示し、Theorell らの実験結果ともよく一致した。骨髓カタラーゼにおける⁵⁹Fe incorporation curve の変動は肝臓カタラーゼのそれに類似の傾向を示したが、その値は肝臓カタラーゼにくらべて著しく高く、また変動の中も大きかった。

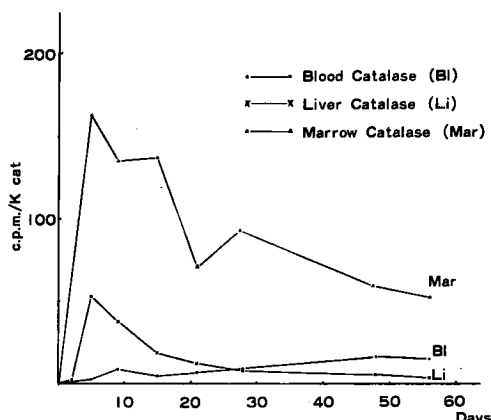


Fig 1 Incorporation of ⁵⁹Fe into Catalase in Guinea Pigs

赤血球に関する実験成績は表2に示した。その⁵⁹Fe incorporation は注射後5日目に高値を示し、以後、時間とともに漸次増加した。なお、放射性物質の体内注入の副作用と思われる貧血などは認められなかった。

第4節 小括ならびに考按

生体内カタラーゼの起源に関して Theorell ら⁷⁾ は血液および肝臓カタラーゼの⁵⁹Fe incorporation curve の間に著しい差異のある点から両カタラーゼは別個の起源と推定した。著者の実験においても、血液および肝臓カタラーゼにおいては Theorell らと類似の成績を得た。骨髓カタラーゼにおいては肝臓カタラーゼと類似の傾向を示したが、実験初期に非常に大きい⁵⁹Fe incorporation のピークが認められた。

ただ、実験動物が小型のため採取骨髓が少量であり、カタラーゼの分離抽出が血液、肝臓にくらべてより困難であったため、骨髓からのカタラーゼの分離が不十分ではなかったかとの懸念が残る。すなわち著者の得た骨髓カタラーゼに対する⁵⁹Fe incorporation curve は Helwig ら¹²⁾ の骨髓における labeled Fe incorporation curve とよく似ており微量の Hb あるいは骨髓蛋白の混入などのため骨髓カタラーゼに対する⁵⁹Fe incorporation 値を高くしなかったかという疑問が生ずる。この疑問に対しては試料よりのできるだけ完全なカタラーゼの抽出と精製が必要と考えられる。この点の検討は次章にゆずる。

赤血球に対する⁵⁹Fe incorporation curve は注射後数日で高値を示し、以後、漸増の傾向を示した。

Table 1. Incorporation of ^{59}Fe into Catalase in Guinea Pigs

Catalase	Time in days	^{59}Fe radioactivity (c. p. m. $\pm$ S. D.)*	K cat	c. p. m./ K cat $\pm$ S. D.
Blood	2	16 $\pm$ 6	38.9	0.4 $\pm$ 0.2
	5	74 $\pm$ 6	27.7	2.5 $\pm$ 0.2
	9	55 $\pm$ 6	6.1	8.4 $\pm$ 1.0
	15	57 $\pm$ 7	13.7	4.2 $\pm$ 0.5
	21	140 $\pm$ 8	22.3	6.3 $\pm$ 0.4
	28	189 $\pm$ 9	20.0	9.5 $\pm$ 0.5
	48	301 $\pm$ 12	18.7	16.1 $\pm$ 0.6
	56	348 $\pm$ 14	23.3	14.9 $\pm$ 0.6
Liver	2	658 $\pm$ 10	241.6	2.7 $\pm$ 0.1
	5	7861 $\pm$ 30	147.0	53.5 $\pm$ 0.2
	9	4240 $\pm$ 22	113.5	37.2 $\pm$ 0.2
	15	3955 $\pm$ 23	214.7	18.3 $\pm$ 0.1
	21	3541 $\pm$ 22	284.0	12.1 $\pm$ 0.1
	28	9174 $\pm$ 35	1137.1	8.1 $\pm$ 0.0
	48	3125 $\pm$ 24	547.9	5.7 $\pm$ 0.0
	56	4681 $\pm$ 30	1307.7	3.6 $\pm$ 0.0
Marrow	5	5309 $\pm$ 24	32.5	163.0 $\pm$ 0.7
	9	3827 $\pm$ 20	28.4	134.8 $\pm$ 0.7
	15	3663 $\pm$ 22	26.8	137.8 $\pm$ 0.8
	21	1844 $\pm$ 16	26.3	70.5 $\pm$ 0.6
	28	3749 $\pm$ 23	40.5	93.5 $\pm$ 0.6
	48	2306 $\pm$ 21	39.3	58.8 $\pm$ 0.5
	56	1629 $\pm$ 20	31.2	52.2 $\pm$ 0.6

Table 2. Incorporation of ^{59}Fe into Red Blood Cells in Guinea Pigs

Time in day	^{59}Fe radioactivity (c. p. m. $\pm$ S. D.)*	Hb concentration (gm/dl)	Specific activity (c. p. m./gm Hb $\pm$ S. D.)
2	236 $\pm$ 7	16.0	15 $\pm$ 0.4
5	19965 $\pm$ 66	15.5	1289 $\pm$ 4.3
9	20499 $\pm$ 68	16.3	1258 $\pm$ 4.2
15	19182 $\pm$ 68	13.6	1410 $\pm$ 5.0
21	22123 $\pm$ 75	14.3	1550 $\pm$ 5.2
28	23855 $\pm$ 78	15.1	1580 $\pm$ 5.2
48	26778 $\pm$ 94	15.0	1785 $\pm$ 6.3
56	24243 $\pm$ 91	14.2	1722 $\pm$ 6.4

* Values are corrected for background and half life.

実験期間を通じて貧血をおこしたり、死亡した動物はなかったので、体重100gm 当たり $5\mu\text{c}$ 程度の放射性物質の注入は動物にとって重大な副作用を生ぜず、したがって実験成績にも影響はなかったものとする。

第5節 結 語

モルモットのカタラーゼ生合成の状態をカタラーゼに対する ^{59}Fe incorporation curve の変動の状態から検討し、同時に赤血球への ^{59}Fe incorporation を追求して次の結果を得た。

1. 血液カタラーゼと肝臓カタラーゼはそれぞれ別個の起源をもつと推定された。

2. 骨髓カタラーゼへの ^{59}Fe incorporation curve は ^{59}Fe 注射後10日までに最高値に達してのち減少した。

3. 赤血球への ^{59}Fe incorporation curve は ^{59}Fe 注射後短時日で急上昇し、以後漸増の傾向を示した。

第3章 家兎のカタラーゼへの

^{59}Fe incorporation に関する実験

第1節 緒 言

第2章の実験成績中、骨髓カタラーゼに対する ^{59}Fe incorporation の値が他の二つのカタラーゼにくらべて著しく高かった点につき、採取骨髓が少量で酵素液の抽出が困難であったため骨髓自体への ^{59}Fe incorporation 値であるかもしれないという疑問が生じた。

これに対し、本章では実験動物としてモルモットより大型の家兎を選び、各カタラーゼを同じ操作で抽出、同一段階まで精製したのち ^{59}Fe incorporation curve を比較した。各カタラーゼ溶液は電気泳動を行なってさらに確認した。

第2節 実験材料および実験方法

1. 実験動物および実験材料

生後60日前後、体重2kg前後の雄の家兎14羽を使用した。放射性同位元素は Oak Ridge National Laboratory 製 $^{59}\text{FeCl}_3$ 塩酸溶液を用いた。

2. 放射性同位元素の注射

$^{59}\text{FeCl}_3$ 溶液を適宜希釈したものを体重1kg当たり $20\mu\text{c}$ の割合で家兎腹腔内へ1回に注射した。注射量は半減期表より算出した。

3. 実験試料の調製方法

^{59}Fe 注射後3, 6, 9, 15日の各日に3ないし4匹の動物を屠殺し、実験に供した。

家兎はラボナール全身麻酔下に開胸し、心臓切開を行なって一気に屠殺、流出する血液は個体ごとに別々の容器に保存したのち、他臓器に対する血液の影響を除くため大動脈から生理食塩水により灌流し、流出液を吸引採取した。灌流は流出液にほとんど血性が認められなくなるまで行なった。抗凝固剤にはヘパリン溶液を用いた。肝臓、長管骨は採取後十分に水洗して、さらに血液を除いた。

すべての材料を氷室に保存したのち、最初に採取した全血のHb量を各固体別に測定し、測定液についてさらに放射能の測定を行ない、放射能の認められた個体を実験に使用した。

血液カタラーゼの調製*

血液を遠沈して血漿を捨て、生理食塩水で3回洗滌したのち2倍量の蒸留水を加えて溶血液とし、そのHb量を測定したのち1.5mlを別に保存した。大部分の溶血液は一夜水冷したのち0.3倍量の $\text{Et-OH} \cdot \text{CHCl}_3$ (3:1)を攪拌しつつ加え、生ずる沈澱を遠沈除去、上清は汙過後アラビヤゴム溶液に透析、濃縮した。濃縮後沈澱を遠沈除去、上清に飽和硫安溶液を加えて28%飽和とし、生ずる沈澱を遠沈除去、上清にさらに飽和硫安溶液を加えて60%飽和とし、生ずる沈澱は少量の蒸留水に溶解し、蒸留水に一夜透析してカタラーゼ溶液を得た。

骨髓カタラーゼの調製

長管骨端を鉗除したのち高圧酸素を用いて骨髓を圧出採取、2倍重量の蒸留水とともに glass homogenizer (Potter-Evelin type) で homogenate とし不溶成分を遠沈除去したのち、上清に血液カタラーゼの場合と全く同じ操作を行なって骨髓カタラーゼ溶液を得た。

肝臓カタラーゼの調製*

索状成分を除いた肝臓を2倍重量の蒸留水とともに glass homogenizer で homogenate とし、不溶性成分を遠沈除去、上清に0.3倍量の $\text{Et-OH} \cdot \text{CHCl}_3$ (5:1)を加え、生ずる沈澱を遠沈除去、上清に純アルコールを加えて60%濃度とし、生ずる沈澱を少量の蒸留水に溶解し、蒸留水に対して一夜透析する。透析後1N醋酸溶液を加えてpH 4.0とし、生ずる沈澱を遠沈除去、上清には以下血液カタラーゼの場合と同一操作を行なって肝臓カタラーゼ溶液を得た。

* 血液カタラーゼ抽出操作の中で濃縮操作を除いて Theorell ら⁷⁾の方法に従った。

4. 放射能の測定

血液, 肝臓, 骨髄各カタラーゼ溶液, および溶血液各1.5mlについて, 神戸工業製ウェル型シンチレーションカウンターにより10分間放射能を測定した. 自然計数は30ないし50分間測定した. 実験期間中の放射能減衰は半減期表により補正した. 放射能測定の標準偏差は前章の式に従って算出した.

5. カタラーゼ活性度の測定

第2章と同じ方法により K cat を測定した. また Lowry-Sutherland³¹⁾ の方法に従って蛋白量 $\mu\text{g/ml}$ を測定した. カタラーゼ活性度は単位蛋白量当たりの K cat すなわち K cat/mgprotein で表わした.

6. Starch Block Electrophoresis

⁵⁹Fe注射後6, 9, 15日の試料について, さらに

精製されたカタラーゼを得るため Kunkel¹⁴⁾ の方法に従い starch block electrophoresis を行なった. 電気泳動後 starch block から各カタラーゼを回収し, それを用いて上記4, 5の実験を行なった.

第3節 実験成績

第1項 カタラーゼに関する実験成績

表3および図2に抽出カタラーゼ* に関する実験成績を示した.

* 記述の便宜上 Et-OH·CHCl₃ により抽出し, 電気泳動を行なう前のカタラーゼを抽出カタラーゼ, starch block electrophoresis を行なってのち回収したカタラーゼを泳動カタラーゼとして区別した.

Table 3. Incorporation of ⁵⁹Fe into Catalase in Rabbits

Catalase	Time in days	⁵⁹ Fe radioactivity (c. p. m. $\pm$ S. D.)*	Catalase activity (K cat/mg Prot.)	Specific activity (c. p. m./catalase) (activity $\pm$ S. D.)
Blood	3	172 $\pm$ 10	4.80	36 $\pm$ 2.1 (28.3%)**
	6	295 $\pm$ 9	3.39	87 $\pm$ 2.7 (68.5%)
	9	448 $\pm$ 11	3.72	118 $\pm$ 3.0 (92.9%)
	15	519 $\pm$ 12	4.10	127 $\pm$ 2.9 (100.0%)
Liver	3	7350 $\pm$ 55	0.78	9424 $\pm$ 70.5 (80.8%)**
	6	7697 $\pm$ 49	0.66	11662 $\pm$ 74.2 (100.0%)
	9	4954 $\pm$ 39	0.53	9347 $\pm$ 73.6 (80.1%)
	15	1899 $\pm$ 27	0.48	3956 $\pm$ 56.3 (33.9%)
Marrow	3	5334 $\pm$ 47	0.15	35560 $\pm$ 313.3 (35.5%)**
	6	4176 $\pm$ 36	0.07	59657 $\pm$ 514.3 (59.5%)
	9	5014 $\pm$ 45	0.05	100280 $\pm$ 900.0 (100.0%)
	15	9991 $\pm$ 60	0.13	76854 $\pm$ 461.5 (76.6%)

* Values are corrected for background and half life.

** Per cent against maximum value.

血液カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation curve は漸増し ^{59}Fe 注射後15日までにピークを作らず (図2-a), 第2章の実験成績ともよく一致した.

肝臓カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation 値の増加は血液カタラーゼにおけるより速やかで, ^{59}Fe 注射後6日目にピークに達し, その後は減少に向かう (図2-b). モルモットでは注射後5~10日の間にピークを形成した.

骨髄カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation curve は ^{59}Fe 注射後9日目にピークを示した (図2-c). その値は血液カタラーゼの 10^3 であった. モルモットでは注射後5~10日後にピークを示しており, 骨髄カタラーゼにおいては注射後10日前後に ^{59}Fe incorporation は最高値に達するものと推定した.

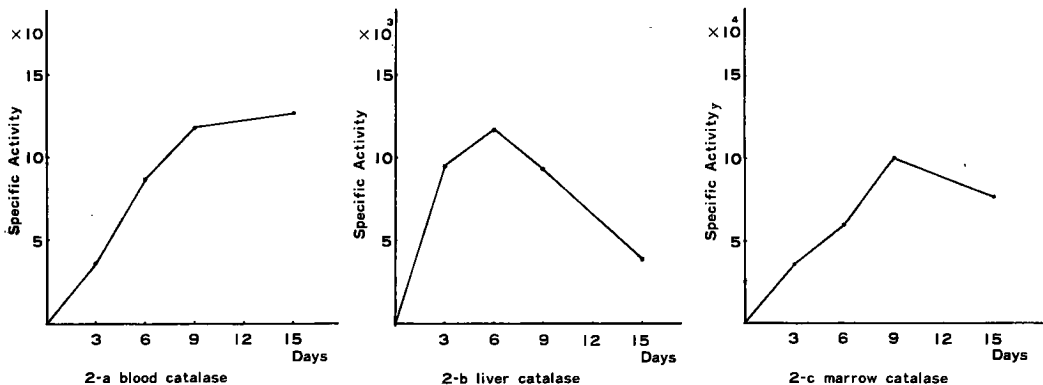


Fig 2 Incorporation of ^{59}Fe into Catalase in Rabbits

第2項 Starch Block Electrophoresis に関する実験成績

表4および図3, 4 に starch block electrophoresis に関する実験成績を示した.

血液カタラーゼにおいては図3のように漸増型の ^{59}Fe incorporation curve を示したのに対し, 肝臓カタラーゼおよび骨髄カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation curve は, ^{59}Fe 注射後, 肝臓カタラーゼにおいては6日目に, また骨髄カタラーゼでは9日目にピークを示した. この ^{59}Fe incorporation curve はいずれも抽出カタラーゼにおけるものとよく類似した. ^{59}Fe incorporation の最高値を100%として表わした場合, 図4-a, 4-b, 4-cに示すごとく, 抽出カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation curve と泳動カタラーゼ* のものとは極めて高い相関関係を示した. このことは前項に述べた実験結果の信頼性を裏付けるものといえる.

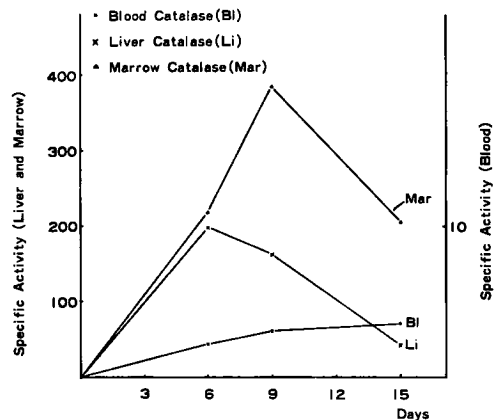


Fig 3 Incorporation of ^{59}Fe into Catalase in Rabbits (in Starch Block Electrophoresis)

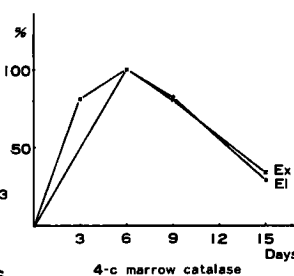
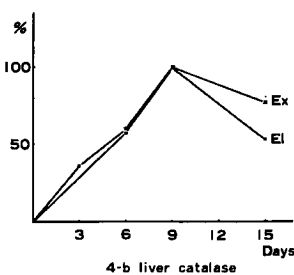
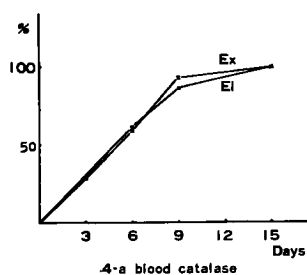


Fig 4 Comparison of Specific Activities of Ex-Catalase* and EI-Catalase in Rabbits (per cent against maximum value)**
 * obtained by Et-OH. CHCl_3 extractinon (Ex)
 ** displaced from starch block after electrophoresis (EI)

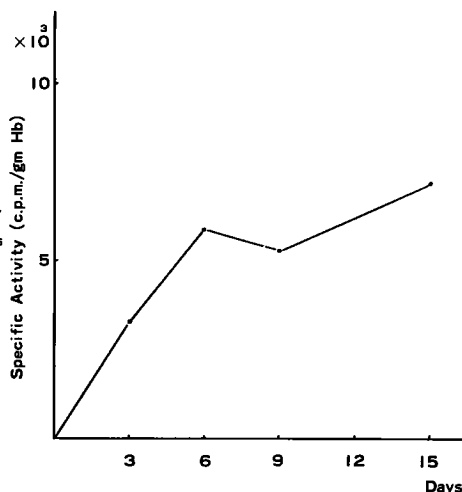


Fig 5 Incorporation of ^{59}Fe into Red Blood Cells in Rabbits

Table 4. Incorporation of ^{59}Fe into Catalase in Rabbits (in Starch Block Electrophoresis)

Catalase	Time in days	^{59}Fe radioactivity (c. p. m./ S. D.)*	Catalase activity (K cat/mg Prot.)	Specific activity (c. p. m./catalase) (activity $\pm$ S. D.)
Blood	6	74 ± 9	34.34	2.2 ± 0.3 (61.1%)**
	9	96 ± 14	30.98	3.1 ± 0.5 (86.1%)
	15	116 ± 9	31.92	3.6 ± 0.3 (100.0%)
Liver	6	213 ± 10	1.07	199.1 ± 9.3 (100.0%)**
	9	109 ± 8	0.68	162.7 ± 11.8 (81.7%)
	15	60 ± 9	2.91	58.8 ± 3.1 (29.5%)
Marrow	6	127 ± 10	0.58	218.9 ± 17.2 (56.8%)**
	9	212 ± 16	0.55	385.5 ± 29.1 (100.0%)
	15	277 ± 11	1.35	205.1 ± 8.1 (53.2%)

* Values are corrected for background and half life.

** Per cent against maximum value

Table 5. Incorporation of ^{59}Fe into Red Blood Cells in Rabbits

Time in days	^{59}Fe radioactivity (c. p. m. $\pm$ S. D.)*	Hb concentration (gm/dl)	Specific activity (c. p. m./gm Hb $\pm$ S. D.)
3	43458 $\pm$ 132	13.4	3243 $\pm$ 9.9
6	61083 $\pm$ 136	10.5	5817 $\pm$ 13.0
9	61756 $\pm$ 197	11.7	5277 $\pm$ 16.8
15	87675 $\pm$ 176	12.2	7186 $\pm$ 14.4

* Values are corrected for background and half life.

第3項 赤血球に関する実験成績

表5, 図5に赤血球溶血液に対する ^{59}Fe incorporation値を示した。この値は第2章の実験成績にほぼ類似し, 実験期間中, 特に明らかなピークを形成することなく漸増した。

第4節 小括ならびに考察

第2章の実験成績のうち骨髓カタラーゼについて試料が少なくカタラーゼの抽出, 精製が不十分ではなかったかという疑問が残った。これについて本章では実験動物を家兎に変え, かつ臓器組織からのカタラーゼの分離抽出を全く同一方法で行ない同一レベルで比較した。さらに starch block electrophoresis を行なってカタラーゼの確認を行なった。したがって実験期間はカタラーゼに対する ^{59}Fe incorporation が最高に達すると思われる注射後15日までで十分と考えた。

Starch block electrophoresis は泳動後試料の回収が容易な点で最適と考えた。泳動の starting point にカタラーゼ水溶液で作った starch block を充填して electrophoresis を行なったので短時間で蛋白の移動がみられた(図6)。短時間で泳動を切り上げたことにより, カタラーゼ活性度への影響は少なかったと考えられるが, 泳動前後における活性度の比較は行なわなかった。

Starting point を陰極から10cmの所におき, 第2節に述べた方法で電気泳動を行ない, Starting point から1cmの所へ移動した蛋白を, さらに精製されたカタラーゼと考えた(図6)。このカタラーゼにおける specific activity は抽出カタラーゼのものより小さくなるが, これは夾雑する変性蛋白などが除外されるためと考えた。

抽出カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation curve は, 血液, 肝臓, 骨髓各カタラーゼのいずれ

においても異なっており, この点からまず血液カタラーゼと肝臓カタラーゼは明らかに別個の起源のものと推定したが, 泳動カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation curve もほぼ同様の推移を示しており, 血液カタラーゼと肝臓カタラーゼは少なくともその起源は別個であることを確認した。さらに二つのカタラーゼの電気泳動における蛋白の移動の差異から, 両者間には性質にも相異のあることが推定された(図6)。また肝臓におけるカタラーゼの生成, 分解もともに速やかなことが推定された。

骨髓カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation が最高値に達すると推定される注射後10日という日数は骨髓内における赤芽球の成熟に要する日数とほぼ一致していることは¹⁵⁾ 骨髓で生成されたカタラーゼが血液カタラーゼへ移行することを示すと考えられる。

Starch block electrophoresis における ^{59}Fe incorporation curve の変動は抽出カタラーゼの場合とほぼ同じであったが, specific activity はいずれも抽出カタラーゼより低値を示した。また, この値は血液カタラーゼでは骨髓カタラーゼの約1/100であった。赤血球の寿命は120日ぐらいで, そのturnoverは1日約0.8%であり, 骨髓はこれを補うに必要なだけの量が活動状態(赤色骨髓)にあると考えられる¹⁶⁾ 以上の2点から specific activity が血液カタラーゼで小さく, 骨髓カタラーゼで大きいこと, また ^{59}Fe incorporation curve が血液カタラーゼで漸増するに対し, 骨髓カタラーゼでは山型となることを説明できる。このピークの形成は, 肝臓ではカタラーゼの生成と同時に分解も速いためであるに対し, 骨髓では生成カタラーゼが赤芽球の成熟とともに血中に移行するためと考えた。

赤血球に対する ^{59}Fe incorporation curve が第

2章の実験成績同様、大きな変動を示さないのは赤血球の turnover の小さいため、この放射能は骨髓で形成された Hb に由来すると考えられる。なお、表 5 に示した Hb 量はカタラーゼ抽出に用いた溶血液の測定値で、全血についての測定値はすべて正常であった。

第5節 結 語

家兎の血液、肝臓、骨髓各カタラーゼに対する ^{59}Fe incorporation について、特に同一レベルでの比較に重点をおいて比較検討した。カタラーゼをさらに精製、確認するため starch block electrophoresis を行なつてのち回収し同様の検討を加え次の結果を得た。

1. 血液カタラーゼと肝臓カタラーゼに対する ^{59}Fe incorporation curve は抽出群、泳動群ともに明瞭な差異のあることから、両者が別個の起源によることが分かった。

2. 血液カタラーゼは骨髓で生成され、赤芽球の成熟とともに血液へ移行すると推定した。

3. 肝臓ではカタラーゼの生成、分解ともに盛なことが推定された。

4. カタラーゼ活性度は血液、肝臓、骨髓の順に高かった。

5. 赤血球に対する ^{59}Fe incorporation curve は漸増の傾向を示した。

第4章 X線照射によるマウスのカタラーゼ活性度の変動に関する実験

第1節 緒 言

放射線は造血臓器に対して特に著しい障害を及ぼすことが知られ、骨髓はX線照射により30分で核分裂の停止、3時間で決定的破壊像を呈するといわれる¹⁶⁾。一方、肝臓は外部からの放射線照射ではほとんど組織学的変化を現わさないため放射線感受性が低い臓器とされている¹⁹⁾。この放射線感受性の差を利用して両臓器の照射後のカタラーゼ活性度の変化を血液、肝臓について比較し、両者の差異や血液カタラーゼの由来について検討を試みた。ただ、肝臓への放射線照射の影響については未知の点が多いので、全身照射と肝臓部照射の2実験を行なつて骨髓照射の影響について考究した。

第2節 実験材料および実験方法

1. 実験動物および実験材料

生後約60日、体重20gm前後の Strong A系 の純系

マウス* の雄のみ43匹を用いた。全身照射群と肝臓部照射群の2群に分け、各々に対照群を設けた。実験には血液と肝臓のみを用い、骨髓は省いた。

2. X線照射法

管球電圧 200KV、電流 25mA、0.5mm 銅 + 0.5mm アルミニウム透過、半価層 1.57mm銅、距離 40cm、116.8r/m をX線を用いて空中線量600rを全身に1回に照射した。

肝臓部照射では、マウスを横一列に固定する板と厚さ2mmの鉛箱を準備し、鉛箱の蓋の部分に肝臓部だけを照射できるように直径約1.5cmの孔を明けた。肝臓部に印をしたマウスを固定板に固定し鉛箱に入れ、肝臓部の印が蓋の開孔部に一致するようにし、半価層1.95mm銅、86r/m、その他は全身照射と同一条件で、空中線量600rを1回に照射した。

3. Hb量の測定

動物を断頭屠殺し、流出する血液をヘパリン加試験管に集め、Hb計 (Coleman 25 Photo-hemoglobinometer) で Hb 量 gm/dl を測定した。

4. Met-Hb量の測定

Evelyn および Malloy¹⁷⁾ の方法を用いた。

5. 血液カタラーゼ活性度の測定

全血を1,000倍に稀釈し第2-、第3章と同じ方法で K cat を測定、活性度は K cat/Hb14gm/dl** で表わした。

6. 肝臓カタラーゼ活性度の測定

摘出肝臓をよく水洗したのち2倍重量の蒸留水を加えて glass homogenizer で homogenate とし、不溶性成分を遠沈除去し、沃度法*** を用い K cat を測定した。また反応液50ml当りの乾燥重量を測定し、活性度を K cat/gmdry weight で表わした。

上記3～6の実験は、全身照射群では照射直後、1時間後、および1、3、6、9、12日後に、また肝臓部照射群では照射後3、6、12日にそれぞれ行なった。

第3節 実験成績

全身照射群と肝臓部照射群の血液および肝臓カタラーゼ活性度の測定値を、それぞれの対照群の値と

* 岡山大学医学部マウスコロニーより提供を受けた

** ヒトの血液カタラーゼ活性度と同じ方法で表現した。

*** Adams¹⁸⁾ の方法に従った。

ともに表6・7, 図7・8に示した。表8, 図9にHb量を, 図10にMet-Hb量を示した。

全身照射群における血液カタラーゼ活性度の低下は軽度であるが, 照射後12日には急に低い値を示した。一方, 肝臓部照射群におけるカタラーゼ活性度は, 照射後3日目に低い値を示し, その後は回復の傾向が認められた。

肝臓カタラーゼ活性度は両群とも対照群にくらべて低い値を示したが, いずれも持続的低下の状態では, 血液カタラーゼのように急激な低下は示さなかった。酵素活性の低下は全身照射の方が大きかった。

Hb量は全身照射直後に一過性の軽度減少を示し, 一旦, 正常に回復するが, 照射後6日以降は加速度的に大きな減少を示した。肝臓部照射群には変化を認めなかった。

Mt-Hb量は全身照射直後に急激な増加を示しており, 24時間以降9日までの間では対照群との間にほとんど差はないが, 照射後12日には急激な減少を示した。

第4節 小括ならびに考按

種々の酵素がin vivoの照射でどのように変化するかは種々様々で, 変化の意味づけも複雑である。現在考えられているのは, 1) 細胞構造の変化に伴い, 核, ミトコンドリア, ミクロゾームよりの酵素の遊離, あるいは酵素への基質の接近が容易となる可能性。2) 酵素の抑制物質が除かれる可能性。3) cell populationの変化により酵素に富む, 放射線感受性の低い細胞が残る可能性。4) ある臓器の重量, もしくは蛋白量の変化により酵素の臓器単位重量, あるいは蛋白量当りの活性が増減するという考え方。5) 酵素そのものの変化, あるいは酵素の合成が盛になるとの考え方などである¹⁾

in vitroの結晶カタラーゼに対するX線照射の酵素活性に及ぼす影響について, Forssbarg²⁰⁾, Sutton²¹⁾ および Barron²²⁾ によると少なくとも3,000r以上の大線量照射を行なったにもかかわらず, 前2者は酵素活性の低下を, Barronらは変化なしとのそれぞれ相反する結果が出ている。したがって600r程

Table 6. Catalase Activity of Blood and Liver after Whole Body X-Radiation in Mice

Time after radiation	Catalase Activity	
	Blood: K cat/Hd (14gm/dl) (M ± S. D.)*	Liver: K cat/gm dry weight (M ± S. D.)*
immediately after	1.77 ± 0.09 (97.3%)**	38.9 ± 3.0 (82.1%)**
one hour	1.70 ± 0.09 (93.4%)	34.0 ± 6.1 (71.7%)
one day	1.74 ± 0.08 (95.6%)	31.7 ± 2.4 (66.9%)
3 day	1.71 ± 0.03 (94.1%)	34.8 ± 2.2 (73.4%)
6	1.74 ± 0.12 (95.6%)	32.9 ± 0.6 (69.8%)
9	1.71 ± 0.13 (94.0%)	29.2 ± 4.2 (61.6%)
12	1.26 ± 0.08 (69.2%)	29.5 ± 2.5 (62.2%)
control	1.82 ± 0.10 (100.0%)	47.4 ± 7.6 (100.0%)

(600r dose of 200KV X-rays)

* Average of 2-6 mice

** Per cent against the activity of unirradiated normal control

Table 7. Catalase Activity of Blood and Liver after Local Radiation to Liver Area in Mice

Time after radiation	Catalase Activity	
	Blood: K cat/Hb (14 gm/dl) (M ± S. D.)*	Liver: K cat/gm dry weight (M ± S. D.)*
3 day	1.27 ± 0.04 (76.5%)**	40.8 ± 2.5 (92.5%)**
6 day	1.57 ± 0.04 (94.6%)	40.0 ± 0.7 (90.7%)
12 day	1.63 ± 0.35 (98.2%)	39.8 ± 1.6 (90.2%)
control	1.66 ± 0.06 (100.0%)	44.1 ± 2.7 (100.0%)

(600r dose of 200KV X-rays)

* Average of 3 mice

** Per cent against the activity of unirradiated normal control

Table 8. Hemoglobin Concentration after X-Radiation in Mice

Time after radiation	Hemoglobin Concentration (gm/dl)	
	whole body radiation (M ± S. D.)*	local radiation to liver area (M ± S. D.)*
immediately after	15.3 ± 0.2 (96.2%)**	
one hour	15.4 ± 0.1 (96.9%)	
one day	15.9 ± 0.4 (100.0%)	
3 day	16.0 ± 0.7 (100.6%)	16.2 ± 0.3 (106.6%)**
6	15.4 ± 1.4 (96.9%)	16.0 ± 0.7 (105.3%)
9	13.5 ± 0.8 (84.9%)	
12	5.6 ± 1.9 (35.2%)	15.7 ± 0.5 (103.3%)
control	15.9 ± 0.4 (100.0%)	15.2 ± 1.0 (100.0%)

(600r dose of 200KV X-rays)

* Average of 2-9 mice

** Per cent against the concentration of unirradiated normal control

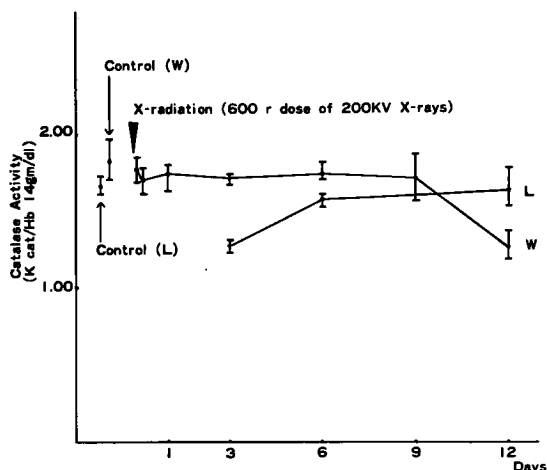


Fig 7 Activity of Blood Catalase after X-Radiation in Mice
(average of 2-6 mice)
W: whole body radiation
L: local radiation to liver area

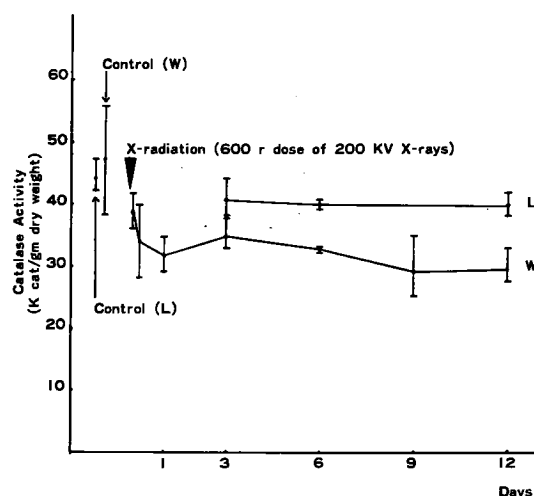


Fig 8 Activity of Liver Catalase after X-Radiation in Mice
(average of 2-6 mice)
W: whole body radiation
L: local radiation to liver area

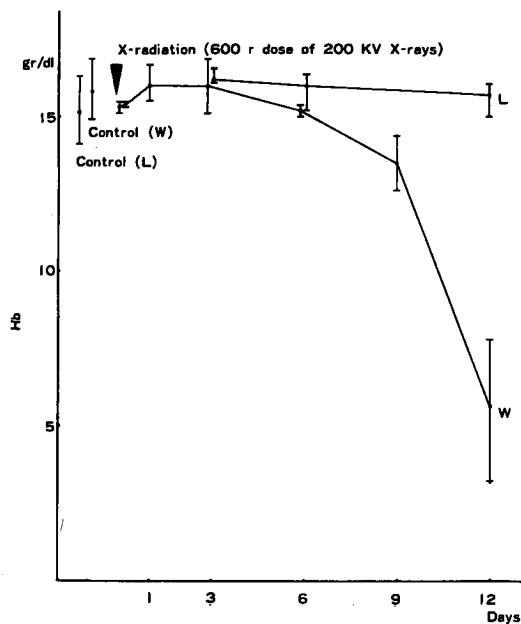


Fig 9 Hemoglobin Concentration after X-Radiation in Mice
(average 2-9 mice)
W: whole body radiation
L: local radiation to liver area

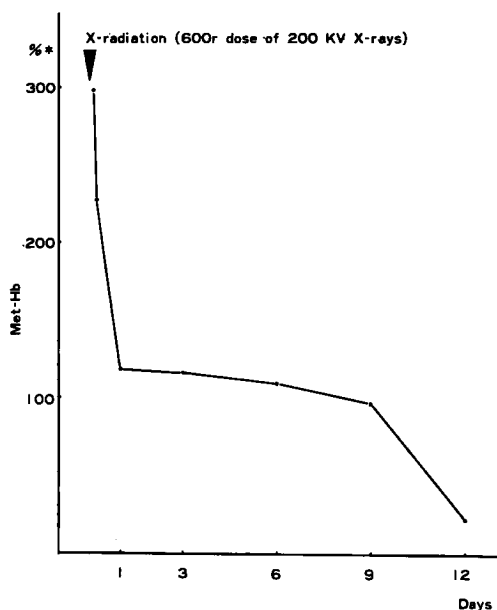


Fig 10 Alteration of Met-Hb Concentration after Whole Body X-radiation in Mice
* Values are expressed as per cent against unirradiated normal control.

度の小線量では酵素自体を変化させる可能性は少ないといえる。

in vivo の照射では、前述のように in vitro の場合に比べてさらに複雑であり、Thomson²³⁾ は動物への照射とカタラーゼの関係に関する論文で、実験条件によって酵素活性の低下、上昇、不変などの種々異なる成績が得られる可能性があると述べた。実際に Ludewig と Chanutin²⁴⁾、Feinstein ら²⁵⁾ および森ら²⁶⁾ の照射実験でも、それぞれ異なる成績が報告された。すなわち Ludewig と Chanutin は大黒ねずみに500rのX線全身照射後、肝臓カタラーゼ活性度に変化なかったのに対し、Feinstein らはマウスに、森らはマウスと大黒ねずみに同じく500rの全身照射を行ない両者とも肝臓カタラーゼ活性度の低下を認めた。著者は照射後の血液一、および肝臓カタラーゼのいずれにも酵素活性の低下を認めたが、変動の状態は両者異なり、また照射方法にもよって異なる値を示した。

血液カタラーゼは600rの全身照射直後から5%程度の酵素活性の低下を示したのち著変を示さず、12日目にいたってHb量の激減を伴う酵素活性の急激な低下を示した。これに対し肝臓部照射では、むしろ回復の傾向が認められた。この相異は骨髓障害の有無によると考えられる。

全身照射直後の酵素活性の低下とMet-Hb量の増加は、放射線により惹起される生化学的反応により生ずる種々の過酸化物質、free radical 特にH₂O₂によると考えられる。すなわち照射後の酵素活性の低下が一過性で進行性でないこと、照射直後に急激なMet-Hb量の増加することの二つの実験結果から、一過性の過剰な基質の生成による酵素の不活性化を原因と推定した。これはAebi²⁷⁾ の in vitro の acatalasemia の赤血球に対する照射後のMet-Hbの増量や、Thomson²³⁾ の過剰の基質が酵素を不活性化すると記載とよく合致する。

一方、肝臓カタラーゼにおいても全身照射による酵素活性の低下が認められたが、血液カタラーゼと異なり持続的低下であり、漸減傾向を示し、急激な低下を示さなかった。また肝臓部照射より全身照射の方が酵素活性の低下が大きいことから、肝臓に対する放射線の直接作用と同時に全射照射の影響による肝機能障害が推定され、Feinstein ら²⁵⁾ も同様の推察を行なっている。

以上の考察から血液カタラーゼと肝臓カタラーゼは別個のものであり、放射線に対する反応の異なる

のは、担癌動物における肝臓カタラーゼと血液カタラーゼの關係に類似しており、いずれも血液カタラーゼと肝臓カタラーゼの起源の相異を示すものと考えた。

全身照射群においてHb量も血液カタラーゼ活性度も低下し回復の傾向がみられないことは骨髓の破壊を意味しており、骨髓が正常と考えられる肝臓部照射群と著しく異なる。これはHbも血液カタラーゼも共に骨髓で生成されることを意味する。

第5節 結 語

1. 血液カタラーゼと肝臓カタラーゼに対するX線照射の影響は明らかに異なることから、血液カタラーゼと肝臓カタラーゼはそれぞれ別個の起源を有するものと推定した。

2. 全身照射と肝臓部照射のいずれの場合にもカタラーゼ活性度は低下するが、全身照射の方が低下度が大であった。

3. 全身照射直後に急激なMet-Hb量の増加と軽度の血液カタラーゼ活性度の低下がみられた。

4. Hb量は全身照射群において照射後6日以降に加速度的に減少するのに対し、肝臓部照射群では変化が認められなかった。

第5章 全章の総括ならびに考按

カタラーゼの生合成についてTheorell ら²¹⁾ は少なくともその起源において、血液カタラーゼと肝臓カタラーゼは別個のものとして推定し、また、東¹⁾ は両者の免疫学的性質の間に若干の差異を認めている。

著者は⁵⁹Feのカタラーゼへのincorporation curveの変動の状態を、血液、肝臓、骨髓各カタラーゼについて追求するとともに、さらに放射線照射が血液および肝臓カタラーゼの活性度に及ぼす影響について検討し、生体内でのカタラーゼ生成について考察した。

まず、⁵⁹Fe incorporation に関して血液カタラーゼと肝臓カタラーゼの間に明らかな差異が認められた。すなわち、モルモット(第2章)および家兎(第3章)において⁵⁹Fe incorporation curve は血液カタラーゼにおいては漸増傾向を示し、肝臓カタラーゼでは速やかにピークに達してのち減少した(表1・3, 図1・2), この成績はTheorell らの実験結果ともよく一致する。

これらのカタラーゼ溶液をさらにstarch block electrophoresis により精製して確認を行なった結果(表3, 図3)も抽出カタラーゼの成績とよく一

致した。また starch block electrophoresis における蛋白の移動 (図6) も血液カタラーゼと肝臓カタラーゼとの間に若干の差異が認められた。

放射線照射によるカタラーゼ活性度の変動も血液カタラーゼと肝臓カタラーゼの間で異なっており (図7・8)、恰も相癌動物において肝臓カタラーゼ活性度が血液カタラーゼ活性度とは無関係に低下する事実に類似した。

以上の諸点より、血液カタラーゼと肝臓カタラーゼは別個の起源によると結論した。

一方骨髓カタラーゼの ^{59}Fe incorporation curve は肝臓カタラーゼと同様にピークを形成した。このピークはモルモットおよび家兎のいずれにも認められたが、ピークに達するまでの日数は両者若干相異した。Helwig ら¹²⁾ はモルモットの骨髓に対する labeled Fe incorporation は腹腔内へ鉄注入後9日目に最高値に達したと報告したが、この結果はモルモットの骨髓カタラーゼに対する ^{59}Fe incorporation curve (第2章) と類似した。ただし、本実験ではこの値が血液一、および肝臓カタラーゼの値にくらべて著しく大きいこと (表1, 図1), この原因として、少量の骨髓からカタラーゼを抽出することの技術的困難さから試料に骨髓成分の混入した可能性が問題となる。この疑点に対し、実験動物にモルモットより大型の実兎を選び (第3章)、充分な量の骨髓を採取し血液一、および肝臓カタラーゼの抽出と同様に硫酸分画によるカタラーゼの分離を行った。これにより骨髓カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation 値に対する骨髓自体への ^{59}Fe incorporation 値の影響は除外でき、また他の二つのカタラーゼとの比較も同一条件下に行なえるものを考えた。

家兎の骨髓カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation 値が最高になるのは抽出、泳動、ともに注射後9日目であった (図2-c)。これは赤芽球が骨髓内で成熟するのに必要な日数とほぼ等しいことから¹³⁾ 血液カタラーゼは骨髓で生成され、赤芽球の成熟とともに血液中に移行するものと推定した。

血液カタラーゼと骨髓カタラーゼの specific activity の差もこの推定を裏づけるように思われる。赤血球の turnover は1日約0.8%とされ¹⁴⁾ そのため血液カタラーゼにおける ^{59}Fe incorporation curve は漸増傾向を示し、specific activity も低かった。これに対し骨髓は赤血球の turnover を補うに足るだけの、赤血球にくらべて少量の骨髓が活動性状態

にあるとされ¹⁵⁾ 当然 specific activity は高くなると考えられ、実験においても血液カタラーゼにくらべて高い値を示した (表3)。

以上より、血液カタラーゼは骨髓において生成されたカタラーゼが、赤芽球の成熟とともに血液中に移行するものであり、両者は肝臓カタラーゼとは別個の起源のものと結論した。

さらにこの点を、骨髓機能を放射線照射で停止させたのちの血液一、および肝臓カタラーゼ活性度の変動を比較して検討した。

放射線照射の影響は骨髓のみにとどまらず、特に致死線量の場合は全身的機能障害を起こすと考えられるので、全身照射後は血液カタラーゼのみでなく肝臓カタラーゼ活性度にも変動を予想した。そこで照射の影響、特に骨髓障害の影響を確認するため、全身照射群と肝臓部照射群とに分け、それぞれ対照群とともに比較検討した。なおカタラーゼ活性度の変動以外に、Hb および Met-Hb 量の測定を同時に行なった。

放射線照射による血液一、および肝臓カタラーゼ活性度の変動状態は異なり、血液では照射直後、一過性に5%前後の低下を示した (図7) に対し、肝臓では照射の影響が持続性であった (図8)、この肝臓カタラーゼ活性度の低下は Feinstein ら²⁵⁾ および森ら²⁶⁾ の報告と類似した。血液カタラーゼ活性度の低下は Thomson²⁷⁾ が述べたように照射直後の Met-Hb 量の増加の状態から、照射による酵素自体の一部不活性化のためと推定された。この結果は acatalasemia の症例において Met-Hb 量の変動が正常人にくらべて大きい事実ともよく合致する²⁸⁾ 赤血球の turnover が補われないと1日約0.8%の Hb の減少が起こるはずであるが、実験ではさらに急激な低下を示した (図9)。これに対し血液カタラーゼ活性度は照射後9日目までは大きな変動を示さなかった。照射後12日には高度の貧血状態となり活性度も著しく低下するが、この値が正常の赤血球の turnover を遥かに上回ることから、骨髓における赤血球の生成が止ると同時に赤血球の破壊も正常時より速くなると思われる。

肝臓カタラーゼ活性度は照射直後に、既に20%程度の低下が認められた。この初期低下は放射線の肝臓に対する直接効果と考えられる。しかし酵素自体は600r程度では変化しないことから、照射により惹起される生化学的反應の結果生じる種々の過酸化物質 free radical, 特に H_2O_2 の影響と考えた。

しかし照射後の肝臓カタラーゼ活性度の持続的低下は、放射線の直接影響というよりはむしろ照射による全身障害によるものであろう。照射による酵素活性の変化の要因は多く(第4章, 第4節), 決定的な議論はできないが, 肝臓部照射群の酵素活性の低下が全身照射群にくらべて軽いことから, 照射による全身障害とそれに起因する肝機能障害の総合したものと考えた。これについて Feinstein ら²⁵⁾ も同じ見解を述べた。

これらカタラーゼ活性度の変動状態は血液カタラーゼの骨髓に由来することを示しており, また家兎カタラーゼの starch block electrophoresis における蛋白移動の状態も血液一, および骨髓カタラーゼは類似するに對し, 肝臓カタラーゼでは若干の相異を示した(図6)ことから血液カタラーゼは骨髓に由来するものと確認した。

赤血球に対する ⁵⁹Fe incorporation curve は漸増の傾向を示し(第3章, 第3節), 赤血球の turnover の少ないことを示した。また ⁵⁹Fe incorporation curve の変動の状態は血液カタラーゼに類似するなどの諸点から, 両者いずれも骨髓で生成されることを確認した。

第6章 結 論

モルモットおよび家兎の血液, 肝臓, 骨髓各カタラーゼにおける ⁵⁹Fe incorporation curve の変動について検討し, その結果を starch block electrophoresis によって確認した。同時に赤血球に対する ⁵⁹Fe incorporation についても調べた。また, 放射線照射によるマウスの血液および肝臓カタラーゼの酵素活性の変動について検討した。

その結果, 血液カタラーゼと肝臓カタラーゼは別個の起源によるもので, 血液カタラーゼは骨髓カタラーゼに由来し, 肝臓カタラーゼは肝臓内にて生成されるものと結論した。

稿を終えるにあたり, ご指導ならびにご校閲を賜った恩師高原滋夫教授に深甚なる謝意を表するとともに, 終始ご懇切なるご指導を頂いた公衆衛生学教空緒方正名教授に厚くお礼申し上げます。論文作製にあたり適切なご指導, ご助言を頂いた耳鼻咽喉科学教室小倉義郎助教授にお礼申し上げますとともに, 本実験において特にご協力下さった耳鼻咽喉科学教室黒田泰生技官に感謝いたします。

なお本論文の要旨は昭和36年11月, 第83回日本耳鼻咽喉科学会中国地方会および昭和39年11月, 第8回産業医学会において発表した。

文 献

1. 高原滋夫, 宮本久雄: 血液「カタラーゼ」欠乏に因ると惟れる歯性進行性壊疽性顎骨炎の臨床的並に実験的研究について, 耳喉. 21, 53, 1949.
2. Takahara, S., Mihara, S., Tsugawa, K., and Doi, K.: Acatalasemia II. Contents of catalase in blood and tissue of men and animals; Proc. Jap. Acad. 28, 383, 1952.
3. Takahara, S.: Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood (Acatalasemia); Lancet 6, 1101, 1951.
4. Nakamura, H., Yoshiya, M., Kaziro, K., and Kikuchi, G.: On "Aenzymia Catalasea," a new type of constitutional abnormality. A biochemical note on the physiological significance of catalase in animal organism; Proc. Jap. Acad. 28, 59, 1952.
5. Kaziro, K., Kikuchi, G., Nakamura, M., und Yoshiya, M.: Die Frage nach der physiologischen Funktion der Katalase im menschlichen Organismus: Notiz über die Entdeckung einer Konstitutionsanomalie "Aenzymia Catalasea," Chem. Ber. 85, 886, 1952.
6. Bonnischen, R. K.: A comparative study of the blood and liver catalase from the horse; Arch. Biochem. 12, 83, 1947.
7. Theorell, H., Béznač, M., Bonnischen, R. K., Paul, K. G., and Åkeson, Å.: On the distribution of injected radio-active iron in guinea pig and its rate of appearance in some hemoproteins; Acta Chem. Scand. 5, 445, 1951.
8. 東恵彦: アイソザイム免疫学的研究, 医学のあゆみ, 54, 324, 1965.

9. 清水栄, 石割隆太郎: 放射能測定法. 化学の領域, 増刊1, アイソトープ実験技術 (第1集), 65, 1955.
10. Von Euler, H. und Josephson, K.: Bezeichnung der Aktivität und Affinität von Enzymen; Ber. dtsh. chem. Ges. **56**, 1749, 1923.
11. Takahara, S., Hamilton, H. B., Neel, J. B., Kobara, T. Y., Ogura, Y., and Nishimura, E. T.: Hypocatalasemia: A new genetic carrier state; J. Clin. Invest. **39**, 610, 1960.
12. Helwig, H. L. and Greenberg, D. M.: Studies on the metabolism of iron-containing proteins with radioactive carbon and iron; J. Biol. Chem. **198**, 703, 1952.
13. Sutherland, E. W. et al.: Purification of the hyperglycemia glycogenolytic factor from insulin and gastric mucosa; J. Biol. Chem. **180**, 825, 1949.
14. Kunkel, H. G.: Zone electrophoresis, Methods of Biochemical Analysis, **1**, 141, 1954.
15. 黒田嘉一郎, 吉川春寿, 中尾喜久, 脇坂行一 (編集): 血液化学, 朝倉書店, 東京, 1963.
16. 江藤秀雄, 栗冠正利, 倉光一郎, 梅垣洋一郎, 田坂皓 (編集): 放射線医学, 医学書院, 東京, 1959.
17. Evelyn, K. A. and Malloy, H. A.: Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulphemoglobin in a single sample of blood; J. Biol. Chem. **126**, 655, 1938.
18. Adams, D. H.: The mechanism of the liver catalase depressing action of tumours in mice; Brit. J. Cancer **4**, 183, 1950.
19. 浮田忠之進: 生化学講座13, 癌・ウィルス・放射線・免疫の生化学, 共立出版, 東京, 1963.
20. Forssberg, A.: Mechanism of action of X-rays on enzymes in water solutions; Nature, **159**, 308, 1947.
21. Sutton, H. C.: Effects of radiation on catalase solutions. I.: kinetic studies of inactivation; Biochem. J. **64**, 447, 1956.
22. Barron, E. S. G., Dickman, S., Muntz, J. A., and Singer, T. P.: Studies on the mechanism of action of ionizing radiation. I. Inhibition of enzymes by X-rays; J. Gen. Physiol. **32**, 537, 1949.
23. Thomson, J. F.: Possible role of catalase in radiation effects on mammals; Rad. Research Supple. **3**, 93, 1963.
24. Ludewig, S. and Chanutin, A.: Distribution of enzymes in the livers of control and X-irradiated rats; Arch. Biochem. **29**, 441, 1950.
25. Feinstein, R. N., Butler, C. L., and Hendley, D.D.: Effect of whole body X-radiation and of intraperitoneal hydrogen peroxide on mouse liver catalase; Science, **111**, 149, 1950.
26. 森和雄, 百木せい子, 伊藤久: X線の肝カタラーゼに及ぼす影響(第1報), 医学と生物学, **18**, 303, 1951.
27. Aebi, H. et al.: Methemoglobinbildung durch Röntgenbestrahlen in normalen und katalasefreien Erythrozyten des Menschen; Experimentia. **18**, 129, 1962.
28. 上代皓三, 中尾喜久: 血色素の臨床と生理. 南山堂, 東京, 1958.
29. 高原滋夫, 無カタラーゼ血液症, 人遺誌. **7**, 37, 1962.

Experimental Studies on Catalase Synthesis in Animals

Yoshio MORITA, M. D.

The Department of Oto-Rhino-Laryngology Okayama University Medical School
(Director: Prof. S. Takahara)

A comparative study was made on the uptake of intra-peritoneally administered radioiron by catalase of blood, liver, and, bone marrow in guinea pigs and rabbits. Radioactivity of ^{59}Fe per catalase activity (c. p. m./K cat/mg protein), viz., specific activity, was greatest in marrow, followed by liver and blood. Maximum incorporation of ^{59}Fe in liver catalase was attained on the 6th day, and in marrow catalase on the 9th day. In blood catalase, however, specific activity continued to increase gradually through the entire experimental period.

These data showed that blood catalase is different from liver catalase in its origin and originates, probably, in bone marrow. And it was demonstrated by these rapid turnover of ^{59}Fe that in liver and bone marrow catalase was labile.

Catalase solutions, then, were evaluated by means of starch block electrophoresis. In each catalase, which is recollected from starch block after electrophoresis, ^{59}Fe incorporation curve was similar to the results above described, so it was made clear that origin of blood catalase is different from that of liver catalase.

Last, some studies were made on the inhibition of catalase activity by X-radiation on mice to confirm, mainly, that blood catalase originates in bone marrow. On the rate of decrease of catalase activity after X-radiation, there were obvious difference between blood and liver. Activity of liver catalase decreased about 20% at the beginning and about 40% at the end of this experiment. On the contrary, the rate of decrease of catalase activity of blood was slight only about 5%. On the last day of the experiment (the 12th), not only catalase activity of blood but hemoglobin concentration showed sudden depression which indicates the destruction of bone marrow by X-radiation.

From these facts, it proved that the origine of blood catalase and liver one are different, and that blood catalase originates in bone marrow.

森田論文附図

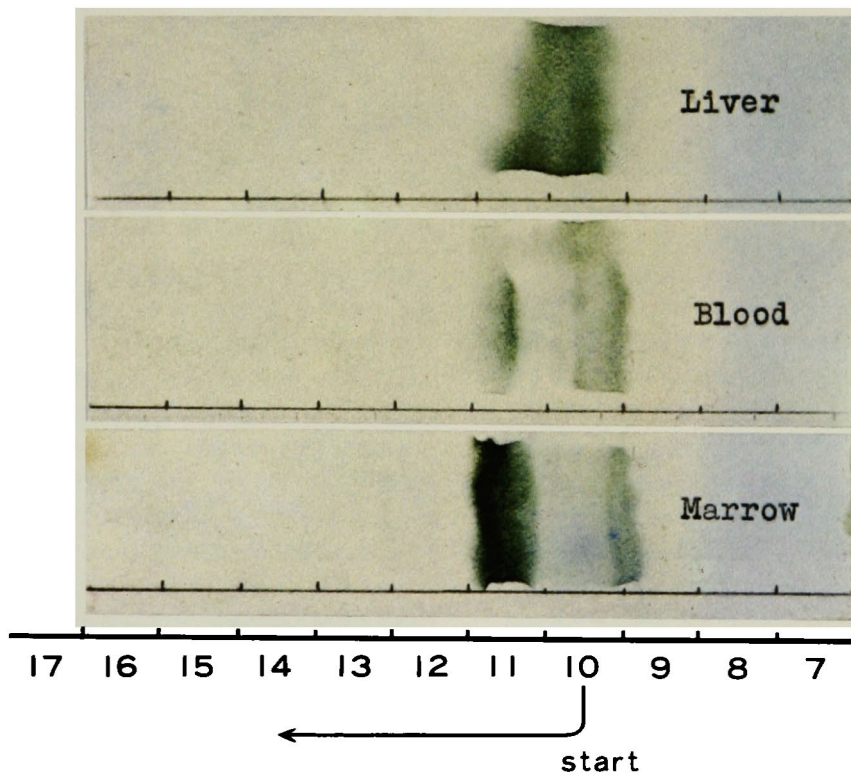


Fig 6 Starch Block Electrophoresis