

低カタラーゼ血液症および無カタラーゼ血液症の蛍光抗体法による研究およびヘモグロビン酸化に関する研究

第 2 編

Choleglobin 生成とカタラーゼ量について

— 特に正常血, 低カタラーゼ血, 無カタラーゼ血を中心に —

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (主任: 緒方正名教授)

岡山大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任: 高原滋夫教授)

大学院生 瀬 戸 章

[昭和47年3月22日受稿]

目 次

I 緒 言
II 実験材料
III 実験方法
IV 実験成績

V 考 按
VI 総 括
VII 参考文献

I 緒 言

人体内の代謝過程で産出される過酸化水素 (以下 H_2O_2 と記す) は, カタラーゼ (以下「力」と略称する) により, 水と酸素に分解されるものと考えられていたが, 高原により無「力」血液症が発見されてより, 「力」の人体内における働きについて, 色々と疑問がもたれた. 無「力」血液症者の場合の体内における, H_2O_2 の処理がいかに行われ, また, いかなる場合に高原氏病, すなわち, 口腔内に潰瘍を形成するにいたるかなどの問題が生じた. さらにまた, 低「力」血と正常血の「力」, および, 無「力」血に残存するごく微量の「力」様物質についても種々な研究が行われてきた. 本研究は主として「力」量 (酵素活性で表わされる.) により, 赤血球の H_2O_2 処理機構にいかなる差異を生ずるかについて, 試験管内において調べたものである.

ヘモグロビンにアスコルビン酸を加えて空気酸化すると, アスコルビン酸の酸化によって H_2O_2 を生じ, H_2O_2 によりヘム部が酸化され, いわゆる choleglobin になる. この場合, 血液中でヘモグロビンと共に「力」が存在すると「力」の作用により, アスコルビン酸の酸化によって産出された H_2O_2 が分解されると考えられる. この choleglobin 生成過程についての研究としては, 本邦では上代, 菊池らの諸研究があり, 「力」の存在する場合, しない場合, アスコルビン酸量との関係などについての実験がある. また, Aebi らは H_2O_2 の存在下で正常人血球, 無「力」血球を使用して, メトヘモグロビン, Choleglobin の生成について実験を行っている. 著者は正常血とその約半分の「力」量しか有さない低「力」血との間では, ヘモグロビン分解機構において差が出て来るものかどうか, そして無「力」血では, いかなるであろうか, などについて実験を行った.

II 実験材料

1. 正常人血液
2. 低カタラーゼ血液症者血液
3. 無カタラーゼ血液症者血液

III 実験方法

アスコルビン酸 (0.4M, 70.4mg) を蒸留水 2 ml に

溶かす。この液は強酸となり酵素が変性するので、1 N の NaOH で中和する。(75% 中和となるようにする。) 0.2 M phosphate buffer (PH 7) を作る。血液は、無「力」血と低「力」血、正常血各 1 ml ずつ取り、遠心沈澱して、上清をすてる。次に 0.9% NaCl で 3 回洗滌後、沈渣の 4 倍量の蒸留水を加える。この血液を表 1 に示すように 6 群に分ける。次いでこれらの群を 0 分、45 分、90 分、180 分に測定する群に

表 1. 測定する溶液

Nor. Blood, Nor. Blood + VC., Hypo. Blood, Hypo. Blood + VC., Acat. Blood, Acat. Blood + VC.

Hemolysate	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
Phosphate Buffer	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml	2.0 ml
Ascorbic Acid	—	0.1 ml	—	0.1 ml	—	0.1 ml
Distilled Water	1.9 ml	1.8 ml	1.9 ml	1.9 ml	1.9 ml	1.8 ml
Total	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml	4.0 ml

分けて、37℃の恒温槽中に三角コルベンに入れて浸す。0 分の群は直ちに、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ を少量添加して反応を止め、その後 1% NaOH 8 ml (全量の 2 倍) を加えて、分光光度計 (Hitachi-Perkin-Elmer 139 UV-VIS Spectro Photo meter) により、618 m μ , 557 m μ , 760 m μ の各波長で測定する。他の群についても反応時間の終了後同様な方法で測定を行う。上記の方法で得た、alkalichromogen の 557 m μ , alkalicholechromogen の 618 m μ および alkaliverdohemochromogen の 760 m μ の吸光度の値を、上代、菊池らによる、Hemoglobin-Ascorbin 酸- O_2 系による反応の過程に伴う吸収像の変化曲線より得られた以下の方程式を用いて算出する。

$$\Sigma_{557} = x + 0.5y + 0.25z$$

$$\Sigma_{618} = 0.03x + y + 0.37z$$

$$\Sigma_{760} = 0.01x + 0.10y + z$$

この式における x, y, z とは、

x; alkaliprotiohemochromogen のみによる, Σ_{557}
 y; alkalicholehemochromogen のみによる, Σ_{618}
 z; alkaliverdohemochromogen のみによる, Σ_{760}

この式より, x, y, z, を求め

$$x = 1.016\Sigma_{557} - 0.501\Sigma_{618} - 0.069\Sigma_{760}$$

$$y = 1.052\Sigma_{618} - 0.028\Sigma_{557} - 0.382\Sigma_{760}$$

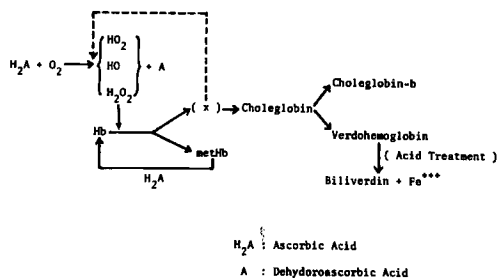
$$z = 1.039\Sigma_{760} - 0.007\Sigma_{557} - 0.100\Sigma_{618}$$

この Σ_{557} , Σ_{618} , Σ_{760} に各々の測定値を代入して, x, y, z, を求めグラフを画く。

IV 実験成績

37℃恒温槽内の三角コルベン中で反応が始ってか

図 1. Choleglobin 生成反応図式



ら 45 分後、図 1, および、表 2 に示すように、アスコルビン酸を加えた正常血、低「力」血、無「力」血の吸光度の間に明瞭な差異を認めた。すなわち、alkaliprotiohemochromogen の減少の程度は無「力」血 > 低「力」血 > 正常血の順に大であり、「力」の含有量の少いほどヘモグロビンの分解がさかんであることがわかる。また、alkalicholehemochromogen の生成は、無「力」血 > 低「力」血 > 正常血の順で大である。一方対象としてアスコルビン酸を加えな

表 2. Choleglobin 生成の時間的变化

	0	45	90	180 min.
Nor. Blood	100 [0]	74.4 [7.0]	53.6 [13.7]	36.0 [18.6]
Hypo. Blood	100 [0]	64.4 [9.1]	42.6 [19.4]	26.2 [21.2]
Acat. Blood	100 [0]	42.2 [19.6]	31.6 [21.6]	18.6 [25.0]

protohemochromogen の %
[] 内 Chleglobin 生成の %

いものは、反応は非常に弱く、無「力」血においても、alkali protohemochromogenの減少を極くわずかに認めたのみである。したがって choleglobin の生成もほとんど認められなかった。90分、180分後の choleglobin の生成量の割合も45分の場合とほぼ同様であった。

V 考 按

人体内に発生する H_2O_2 の分解は「力」により行われるものと考えられていたが、無「力」血液症のような「力」がほとんど無い場合、また低「力」血液症のように「力」を正常人の約半分の量しかもっていない場合もあり、特に無「力」血液症の場合には口腔内に潰瘍を生じる者と、全く症状の出ない者があり、 H_2O_2 の分解機構に関して種々の疑問を生ずる。現在多少とも H_2O_2 の分解能力を有するものとして、「力」の他に、ペルオキシダーゼ、メトヘモグロビンなどが考えられているが、これらのどれも「力」と比較すれば、その「力」様作用は、はるかに弱いものである。たとえば比較的作用の強いといわれているペルオキシダーゼも人血中では赤血球中の glutathion peroxidase をのぞいては白血球などに微量含まれているにすぎない。

無「力」血液症の場合、わずかに残存する「力」様物質（正常血中の「力」量の $\frac{1}{500} \sim \frac{1}{1000}$ ）および前述のペルオキシダーゼ、メトヘモグロビン等により、正常人の代謝過程に異常を来さない程度の速さで H_2O_2 が処理されているのではないかと考えられる。ただ何らかの外的原因（細菌感染等）で体内

に H_2O_2 の異常発生が起きた場合にのみ、高原氏病が発生するのではないと思われる。

本研究の主たる目的は、「力」の量的差により、体内において実際に H_2O_2 によるヘモグロビンの酸化作用に相違が出るものかどうかを、Hemoglobin-Ascorbin 酸- O_2 系におけるヘモグロビンの分解系で調べたものであるが、この機構図式は大体図2に示されている様なものとされている。すなわち、アスコルビン酸が酸化されることにより H_2O_2 を生じるが、これが $HbFe^{++}$ に作用し、Choleglobin 変って行く過程で、 H_2O_2 が「力」により分解され、そのために choleglobin の生成が遅れるものと考えられる。

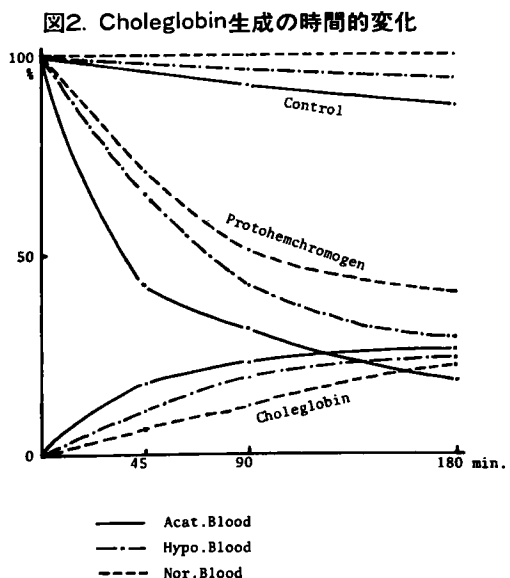


図2で(x)とあるのは、上代¹⁾らが仮定したヘモグロビン分子の変形したものであり、choleoglobin生成反応に重要な役割をはたしていると考えられている。この様なヘモグロビンの酸化分解過程が「力」の量によって支配され、無「力」血>低「力」血>正常血の順に分解が強くなっていることが本研究で明らかとなった。

VI 総 括

正常血、低「力」血、無「力」血について、試験管内において、Hemoglobin-Ascorbin 酸- O_2 系におけるヘモグロビン分解系で、choleoglobinの生成量および、反応速度について実験を行った。その結果、「力」の多い順序すなわち、正常血、低「力」

血、無「力」血の順でヘモグロビンの分解が抑制されていることが明らかになった。特に無「力」血の場合は「力」の欠損により H_2O_2 の分解が明らかに遅れ、ヘモグロビンの分解速度が大であることが認められた。この結果からして、生体内においてもこれら3者の間において、 H_2O_2 によるヘモグロビンの酸化速度の差があることが明らかとなった。

稿を終わるに臨み、ご指導とご校閲を賜った恩師緒方正名教授および高原滋夫教授に深く謝意を表します。さらに実験に協力下さった耳鼻咽喉科教室黒田泰生技官ならびに公衆衛生学教室技術員各位に感謝致します。

参 考 文 献

- 1) Kaziro, K. et al.: Verdohemoglobin, an immediate precursor of biliverdin in the mode reaction of hemoglobin breakdown in vitro. *J. Biochem.* **42**, 423, 1955
- 2) 菊池吾郎: Choleglobin 生成反応の定量化について, *生化学*, **23**, 137, 1951
- 3) 上代皓三: 血色素の分解反応・生化学, **26**, 177, 1954
- 4) 中尾善久, 上代皓三: 血色素の生理と臨床, 医学書院, 東京, 1958
- 5) 折田洋造: 無カタラーゼ血症におけるヘモグロビンの分解について, *人類遺伝学雑誌*, **7**, 163, 1962
- 6) Aebi, H et al.: Observation in two Swiss family with acatalasemia II. *Enzymol. biol. clin.* **4**, 121, 1964
- 7) 高原滋夫: 無カタラーゼ血液症, *人類遺伝学雑誌*, **7**, 37, 1962
- 8) Takahara, S, et al.: Hypocatalasemia, A New Genetic Carrier State. *ABCC Technical Report.* **05 - 59**, 1959

STUDIES ON THE CATALASE IN HYPOCATALASEMIC AND ACATALASEMIC
BLOOD BY IMMUNOFLUORESCENT ANTIBODY AND ON THE OXIDATION OF
HEMOGLOBIN IN THESE BLOOD.

By

Takashi Seto

From the Department of Public Health and Oto-Rhino-Laryngology,

Okayama University Medical School

(Director: Prof. Masana Ogata and Prof. Shigeo Takahara)

11. The Quantitative Representation of the Reaction Processes of Choleglobin Formation from
Normal, Hypocatalasemic and Acatalasemic blood.

The oxidation of hemoglobin with ascorbic acid gives formation to choleglobin. In these reaction processes, catalase decomposes H_2O_2 and inhibits choleglobin formation. In this experiment, we compared the degree of hemoglobin oxidation in human acatalasemic blood to that in human hypocatalasemic and normal blood.

Results obtained were as follows:

Choleheme increased with decrease in protoheme at the initial stage. After a certain time of the reaction, however, the formation of choleheme remained stationary and the formation of choleglobin was lower in the hypocatalasemic blood than the acatalasemic blood and in the case of the normal blood it was the lowest.
