

無カタラーゼ血液症に出現する高原氏病の 成因についての実験的研究

第 II 編

酸化酵素に対する過酸化水素の影響についての生化学的研究

岡山大学医学部公衆衛生学教授（指導：緒方正名教授* 高原滋夫教授**）

竹 久 亨

〔昭和 42 年 12 月 26 日 受稿〕

内 容 目 次

第 1 章 緒 言

第 2 章 実験材料並びに実験方法

第 1 節 実験材料

第 2 節 実験方法

第 3 章 実験成績

I 動物実験

II 試験管内実験

- A) 各組織ホモジネートおよびミトコンドリアのコ脱系の H_2O_2 添加による活性阻害
B) マウス肝および大腿筋肉ホモジネートのコ脱系活性の H_2O_2 添加後の回復について

第 4 章 総括並びに考按

第 5 章 結 語

第 1 章 緒 言

第 1 編においては血液カタラーゼ含量が少なく、無カタラーゼ血液症（以下無カ血症と略）により近いアヒルと、血液カタラーゼが多く正常人群により近い家兎の口蓋粘膜に、各種濃度の過酸化水素含有生理的食塩水（以下 H_2O_2 生食液と略）を注射し、一定時間後生じた病変の肉眼的観察および病変部のコハク酸脱水素酵素系（以下コ脱系と略）活性の組織学的染色を nitro-blue tetrazolium chloride を用いて行ない両者を比較検討した。その結果アヒルの口蓋粘膜組織は家兎に比べて H_2O_2 に対する抵抗性が低く、それによる組織化学的なコ脱系活性の阻害もアヒルの口蓋粘膜組織中の粘膜上皮および血管壁に著しく現われることが判明した。そしてアヒル口蓋粘膜はカタラーゼ含量が少ないために、注射された H_2O_2 の分解が少なく、この H_2O_2 により組織中のコ脱系の活性が強く阻害されると考えた。

本編においてはさらにこの事実を明確にする目的で、細胞の生存に重要な位置を占めるコ脱系の H_2O_2 添加による阻害度を定量的に測定した。すな

わち *in vivo* においてアヒルの口蓋粘膜に H_2O_2 を注射した後のコ脱系活性の注射側と対照側の比較を行ない、次いで *in vitro* の実験としてアヒルおよび家兎の口蓋粘膜、マウスの肝臓および大腿筋肉を用いて、 H_2O_2 添加によるコ脱系活性の阻害度について定量的な測定を行なったのでここに報告する。

第 2 章 実験材料並びに実験方法

第 1 節 実験材料

In vivo の実験ではアヒルを用い、その口蓋粘膜下に第 1 編に述べたと同様に 1% H_2O_2 生食液 0.5ml を注射した。

In vitro の実験ではマウス肝臓および大腿筋肉、アヒルおよび家兎の口蓋粘膜を使用した。

マウス肝ホモジネートはリン酸緩衝液中で Potter Evelyn 型のホモゲナイザーを用いてホモゲナイズしたもので、マウス肝ミトコンドリアは Hogeboom, Schneider¹⁾ 法で取り出したものを使用した。両者に前処理として後述の濃度で窒化ソーダ（以下 NaN_3 と略）を加えカタラーゼを非活性化とした無カ血症類似のものと、 NaN_3 非添加のカタラーゼ活

* 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教室

性高値を示すものを作り、両者の H_2O_2 添加によるコ脱系活性の阻害度の比較を行なった。また口蓋粘膜組織を取り上げ、血液に微量のカタラーゼしか含有せず無カ血症に近い状態にあるアヒルのそれと、血液カタラーゼが正常人に近い家兎のそれとの比較を行なった。

次に実験に使用した H_2O_2 (試薬特級、江戸川製) は、30% (v/v) H_2O_2 を過マンガン酸カリ法で滴定して力価を測定し、これを希釈して 0.05 M の H_2O_2 を作り、これをさらに 0.025M, 0.01M, 0.005M に希釈して使用した。

第2節 実験方法

コ脱系活性の測定は小田²⁾の方法に従って行なった。すなわち表1に示す如く、各組織ホモジネート 0.2ml にまず上記各濃度の H_2O_2 0.1ml を加え、次いで 0.4M コハク酸ソーダ 0.1ml, 0.4% neotetrazolium chloride (以下 NT と略) 0.1ml および蒸溜水 0.1ml を加えて反応液総量を 0.6ml とした。マウス肝ホモジネートおよびミトコンドリアのカタラーゼの非活性化は、 H_2O_2 添加前に 6×10^{-2} M NaN_3 0.1ml を加えて行なった。

上記の反応液は 37°C の恒温槽で30分間反応後、10%ホルマリソ 0.4ml を加えて反応を停止させた。NT の還元により生じた diformazan を 1 : 1 のエーテル・アセトン 7ml で抽出し、分光光度計を用いて 520 m μ の吸光度を測定した。同時に基質であるコハク酸ソーダを除いた自家呼吸反応による吸光度を同様にして測定した。

アヒルおよび家兎の口蓋粘膜のコ脱系の測定の場合

合は、酵素活性が肝臓や筋肉に比較して非常に低いために、反応時間を60分とし、2.5ml の抽出液で抽出し、マイクロセルを用いて吸光度を測定した。

第3章 実験成績

I. 動物実験 (in vivo experiment)

アヒル口蓋粘膜のコ脱系の H_2O_2 生食液注射による活性阻害について

H_2O_2 生食液注射によるコ脱系の阻害度を定量的に観察するために、注射部位と対照側のコ脱系の活性測定を行なった。すなわち生理的に口蓋裂のあるアヒルの一側の口蓋粘膜下に 1% H_2O_2 生食液 0.5ml を注射し、一定時間後に断頭し、生じた発赤、腫脹、苔被形成等の病変部の粘膜を筋肉組織を含め様に注意して切除し、同様に切除した非注射側正常粘膜の両者のコ脱系活性を同時に測定して比較した。酵素活性の測定方法は前述の如く 0.1M リン酸緩衝液 0.2ml 中に口蓋粘膜ホモジネート 20mg (湿重量) を含有させ、0.2M コハク酸ソーダ 0.2ml, 0.2% NT 0.2ml を加え、37°C で1時間反応させた。

1回注射24時間後と24時間間隔4回注射24時間後のそれぞれのコ脱系の阻害状態は表2に示す如くである。各動物1匹における表中の測定値は、各ホモジネートで定量した際の吸光度測定値 2 ~ 5 測定サンプルの平均を示し、注射側粘膜の非注射側正常粘膜に対する酵素活性度をパーセンテージで表わした。1回注射24時間後群ではアヒル5匹使用した残存酵素活性率の平均は68.8%であり、24時間間隔4回注射群では同じく5匹使用した残存酵素活性率の平均

表1 コハク酸脱酸素酵素系活性の測定法

Method for the colorimetric estimation of the succinoxidase system activity with neotetrazolium chloride.

Reaction medium :

Tissue homogenate or mitochondria

(e. g., containing 5mg of liver tissue per 0.2 ml.

of 0.1 M phosphate buffer solution (pH 7.6) 0.2 ml.

Sodium azide (6×10^{-2} M) or distilled water 0.1 ml.

Various concentration of hydrogen peroxide 0.1 ml.

Sodium succinate solution (0.4 M) 0.1 ml.

Neotetrazolium chloride solution (0.4%) 0.1 ml.

Reaction temperature and time: 37°C, 30 min.

Stopping the reaction with 0.4 ml of 10% formalin solution.

Extraction of diformazan with ether-acetone (1:1).

Measurement of optical density (520 m μ).

表2 アヒル口蓋粘膜におけるコハク酸脱水素酵素系の H_2O_2 注射による阻害
(1% H_2O_2 生食液 0.5 ml)

1 回 注 射 24 時 間 後				24時間間隔 4 回注射24時間後			
症 例	正 常 (非注射側)	注 射 側	注射側 正常 $\times 100$	症 例	正 常 (非注射側)	注 射 側	注射側 正常 $\times 100$
I	0.067	0.051	76.1 %	I	0.051	0.031	58.8 %
II	0.079	0.056	70.9 %	II	0.049	0.022	44.9 %
III	0.092	0.056	60.9 %	III	0.049	0.032	65.3 %
IV	0.058	0.039	67.2 %	IV	0.058	0.034	58.6 %
V	0.067	0.046	68.7 %	V	0.079	0.036	45.6 %
平均値	0.073	0.050	68.8 %	平均値	0.057	0.031	54.6 %

は54.6%であつた。すなわち H_2O_2 注射回数が多くなると酵素活性の低下が著しくなつた。推計学的検定(t検定)では1回注射群における非注射側の酵素活性度の算術平均値0.073と注射側のそれ0.050との差異、および4回注射群の非注射側のそれ0.057と注射側のそれ0.031との差異は、両者共危険率1%以下で有意義であつた。

この事実はカタラーゼの少ないアヒルにおいて、 H_2O_2 の注射により生体内終末呼吸酵素系で必須の役割を占めるコ脱系の活性が阻害されることを意味するものである。

II. 試験管内実験 (in vitro experiment)

A) 各組織ホモジネートおよびミトコンドリアのコ脱系の H_2O_2 添加による活性阻害

In vivo の知見をさらに明らかにするために、ホモジネートおよびミトコンドリア中のコ脱系に対する H_2O_2 の添加実験を行なつた。

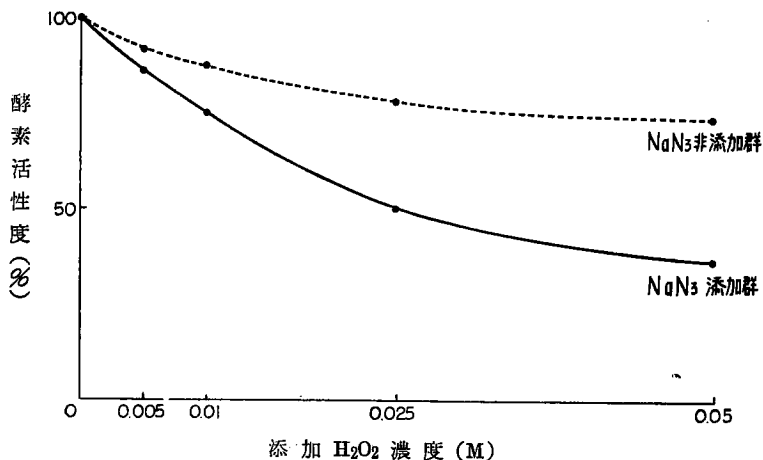
1) マウス肝ホモジネートのコ脱系活性の H_2O_2

添加による阻害

まず Warburg 検法³⁾によりマウス肝臓のカタラーゼ活性値を求めた所、Q Kat. = 1,090 で高値を示した。

表1の如く 0.1M リン酸緩衝液 0.2ml 中に肝組織 5mg (湿重量) を含有させた。このホモジネートに $6 \times 10^{-2}M$ NaN_3 0.1ml を加えてカタラーゼを非活性化とした無カ血症類似のものと、 NaN_3 の代りに蒸溜水 0.1ml を加えたカタラーゼ活性の高いものの両者の H_2O_2 添加によるコ脱系の阻害状態の比較を行なつた所、図1の如き結果を得た。

グラフの横軸は H_2O_2 の濃度 (0より0.05M) を表わし、縦軸は H_2O_2 非添加時のそれぞれの吸光度を100%とした場合の各濃度の H_2O_2 添加後の吸光度であり、残存酵素活性度の割合を示す。なおコ脱系活性による各吸光度は以下の実験においても、基質であるコハク酸ソーダを除いた自家呼吸によるそれぞれの吸光度を差引いたものである。 NaN_3 添加

図1 マウス肝ホモジネート中のコハク酸脱水素酵素系活性の H_2O_2 添加による阻害

による無カ血症類似のもの、 NaN_3 非添加の高い活性度のカタラーゼを含有するもの、両者共に H_2O_2 添加によりコ脱系活性の低下が認められた。それは前者 (NaN_3 添加群) に著明で、 0.025M H_2O_2 添加では残存コ脱系活性度は前者 50%、後者 (NaN_3 非添加群) 78%であり、 0.05M H_2O_2 では前者 36%、後者 74%と 0.05M 以下の濃度の H_2O_2 添加では、濃度の上昇に従って両者の差が著しくなった。なおグラフの各点の値は各動物 4 例の平均値である。

2) マウス肝ミトコンドリアのコ脱系活性の H_2O_2 添加による阻害

Hogeboom, Schneider 法で取り出したミトコンドリアは、元の肝重量の 19 倍量の 0.1M リン酸緩衝液中に極めてゆるいテフロンホモゲナイザーを用いて懸濁させた。 NaN_3 の添加、非添加および H_2O_2 の添加方法は、マウス肝ホモジネートの場合と同様に

行なつた。その成績は図 2 に示す如く、精製後もミトコンドリアはカタラーゼの一部が含まれるので、コ脱系は NaN_3 添加による無カ血症類似のものが、非添加のものに比べて酵素活性の低下が著しく、ホモジネートの場合と大体同じ結果を得た。

3) マウス大腿筋肉ホモジネートのコ脱系活性の H_2O_2 添加による阻害

まずマウス大腿筋肉のカタラーゼ活性度を Warburg 検圧法で求めた結果、 $Q_{\text{Kat.}} = 60$ で低値を示した。それ故 NaN_3 非添加の際にも無カ血症類似状態であるマウス大腿筋肉を用いて、 H_2O_2 添加によるコ脱系の阻害状態を調べた。

マウス大腿筋肉含量は 0.1M リン酸緩衝液 0.2ml 中に 7mg (湿重量) となる様にした。添加 H_2O_2 は肝ホモジネートと同じ条件下で行なつた。その成績は図 3 に示す如くである。すなわち 0.05M 以下の

図 2 マウス肝ミトコンドリア中のコハク酸脱水素酵素系活性の H_2O_2 添加による阻害

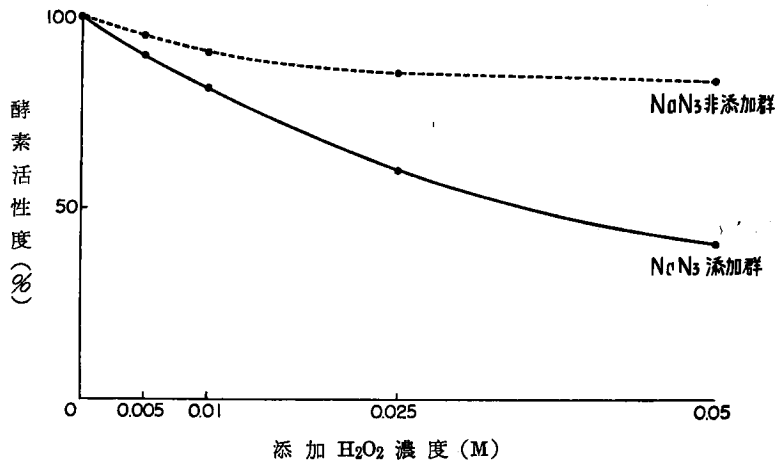
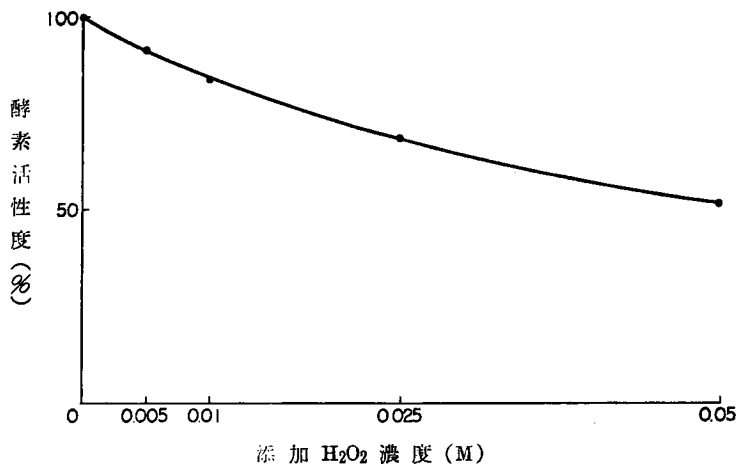


図 3 マウス大腿筋肉ホモジネート中のコハク酸脱水素酵素系活性の H_2O_2 添加による阻害



H_2O_2 では、添加濃度の上昇に従い酵素活性の低下が著しくなり、0.05M H_2O_2 添加では48%の活性低下度を示した。コ脱系自体に肝臓のそれと多少差があるかも知れないが、肝臓に比較してカタラーゼが低いためにコ脱系の活性低下が著明に出現したと考えられる。

4) アヒルおよび家兎の口蓋粘膜ホモジネートのコ脱系活性の H_2O_2 添加による阻害

実験に用いたアヒルの口蓋粘膜の Q Kat. は 41, 家兎のそれは 260 で両者に明らかな差があつた。また血液のカタラーゼ値はアヒル24で無カ血症者に近く、家兎は4890 (いずれも Warburg 検圧法による) と正常人により近かつた。

口蓋粘膜は両者共ガラスホモゲナイザーを用いてホモジナイズして、0.1M リン酸緩衝液 0.2ml 中に 20mg (湿重量) 含有させた。 H_2O_2 添加は前述の諸実験とほぼ同じ条件下で行なつた。その成績は図4に示す如くである。すなわち両者共 H_2O_2 添加によ

りコ脱系に活性低下が認められたが、阻害度50%を示す H_2O_2 濃度はアヒルでは 0.005M であり、家兎は 0.05M であつた。この様にカタラーゼ活性の少ないアヒルは低濃度の H_2O_2 添加によつてもコ脱系の阻害が著しかつた。

B) マウス肝および大腿筋肉ホモジネートのコ脱系活性の H_2O_2 添加後の回復について
コ脱系に対する H_2O_2 の阻害作用は一過性のもの (reversible) か、完全に阻害され回復されぬもの (irreversible) であるかを明らかにするために、 H_2O_2 添加後各時間におけるコ脱系の活性度を測定した。すなわち各ホモジネートに 0.05M H_2O_2 0.1 ml を添加した後、0, 5, 10, 30, 60分間 5°C の冷凍室に放置した場合の酵素活性を測定し、時間の経過による回復の有無を調べた。その成績は図5に示す如くである。マウス肝ホモジネートにおいては、カタラーゼ活性の強い10分まで急激に回復し、その後徐々に回復があり、添加後60分で非添加時の93%

図4 アヒルおよび家兎の口蓋粘膜ホモジネート中のコハク酸脱水素酵素系活性の H_2O_2 添加による阻害

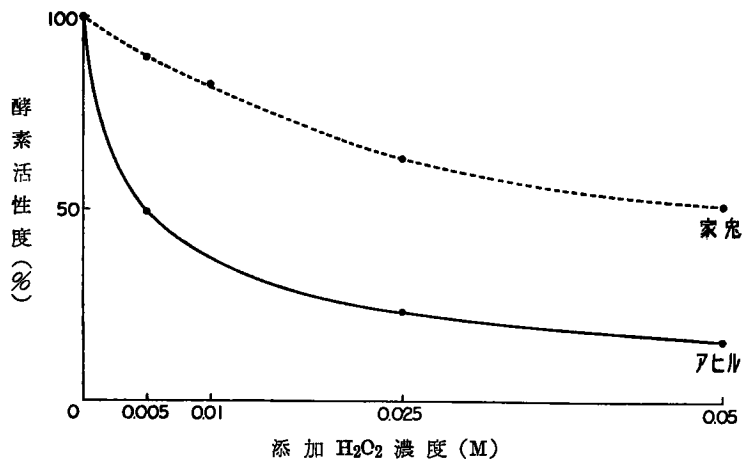
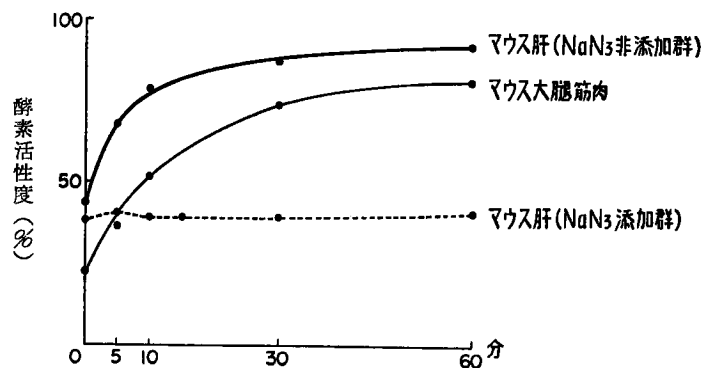


図5 マウス肝および大腿筋肉ホモジネート中のコハク酸脱水素酵素系活性の H_2O_2 添加後の回復曲線



にまで回復が行なわれた。この事実は H_2O_2 の添加によるコ脱系の阻害が reversible であることを示すものと考えられる。そして阻害度は H_2O_2 のみの濃度に依存する度合いが高いと推定される。その原因の一部として、SH 基が酸化され $-\text{S}-\text{S}-$ となつたものが、 H_2O_2 の濃度が低くなると共に、一部 $-\text{S}-\text{S}-$ より $-\text{SH}$ への還元過程が起ることが推定される。カタラーゼ値の低いマウス大腿筋肉ホモジネートでは、阻害度も強く回復度も81%と肝臓の場合に比べ低かつた。これは少量の H_2O_2 の残存によつて、コ脱系の一部に irreversible の変化が起つているものと推定される。一方 $6 \times 10^{-2} \text{ M NaN}_3$ 0.1ml を添加したマウス肝ホモジネートでは、時間の経過にかかわらず H_2O_2 非添加時の40%前後の残存酵素活性を示し、回復は全く認めなかつた。その原因として、

- 1) 高濃度の H_2O_2 の存在のもとに無カ血症類似の組織ではコ脱系が irreversible にまで阻害される。
- 2) NaN_3 と H_2O_2 が共に作用した場合には、コ脱系が irreversible になる、の二つが考えられる。この点に関しては次報に述べる予定である。

第4章 総括並びに考按

以上の実験成績を総括すると

1) カタラーゼ活性の低いアヒル口蓋粘膜に、1% H_2O_2 生食液 0.5ml を注射した場合のコ脱系活性の阻害状態は、1回注射24時間後の場合と、24時間間隔 4回注射24時間後の場合の両者共に、非注射側に比べて注射側のコ脱系活性の低下が認められた。そして1回注射の場合は非注射側の68.8%の酵素活性を示し、4回注射では54.6%と酵素活性の低下が進んだ。

2) 各組織ホモジネートのコ脱系の H_2O_2 添加による阻害状態は、カタラーゼ活性の高い組織ホモジネートも、カタラーゼ活性の全く認められないか、もしくは非常に低い acatalasemic の場合も、共に H_2O_2 の添加によりコ脱系活性の低下が認められたが、後者において著明であつた。添加 H_2O_2 濃度 0.05M (終濃度 $8.33 \times 10^{-3} \text{ M}$) 以下では、添加 H_2O_2 濃度の上昇につれ、両者共にコ脱系活性は低下し、また両者の活性低下の差も開く傾向にあつた。

3) 各組織ホモジネートに 0.05M H_2O_2 0.1ml を添加し、0~60分間 5°C の冷凍室に放置した後のコ脱系活性の回復状態は、カタラーゼ活性高値を示すマウス肝臓のみでなく、カタラーゼ活性の低いマウス大腿筋肉も、時間の経過と共に酵素活性の回復

を見て、それは前者に著明であつた。これに対して $6 \times 10^{-2} \text{ M NaN}_3$ を添加しカタラーゼを非活性化としたマウス肝臓の場合は、時間の経過による酵素活性の回復は認められなかつた。

以上の実験成績の総括に考按を加えると、

1) 血液に微量のカタラーゼしか保有しないアヒルの口蓋粘膜に H_2O_2 を注射した場合に、注射側のコ脱系活性の低下が認められ、注射回数が増すと酵素活性の低下が著明となつた。このことは生体内において H_2O_2 が何らかの理由で生理的範囲を越えて発生した場合、acatalasemic の組織ではカタラーゼが少ないために H_2O_2 の分解が少なく、従つてコ脱系が濃い濃度の H_2O_2 と触れる。それによつてコ脱系が強く阻害されることを示している。

2) 各組織ホモジネートに H_2O_2 を添加した場合、カタラーゼ活性が高値を示す組織では、添加された H_2O_2 をこのカタラーゼが分解するために、コ脱系が濃い濃度の H_2O_2 と触れる機会を少なくして、コ脱系活性の低下を防止する。これに対して acatalasemic の組織では、カタラーゼによる H_2O_2 の分解が少ないか、ほとんど無いために、コ脱系活性の阻害が著明に現われるものと考えられる。

3) 各組織ホモジネートに H_2O_2 を添加した時のコ脱系の回復実験より、 H_2O_2 はコ脱系を阻害するが、その変化は reversible であり、カタラーゼによつて H_2O_2 が分解され H_2O_2 の量が減少すると活性度は回復すると考えられる。

以上の実験成績の考按にもとづき、高原氏病の成因について考察すると、

人の口腔内に肺炎双球菌、溶連菌等のカタラーゼを保有しない H_2O_2 産生菌感染が起り、 H_2O_2 が産生された場合、正常人ではこの H_2O_2 により一時的にコ脱系の如き呼吸酵素に阻害が起つてもすぐ回復されるか、あるいは流血中の高値を示すカタラーゼによつて、産生された H_2O_2 が直ちに分解され何等障害が起らないと考えられる。これに対して無カ血症者では、この H_2O_2 を分解し切れぬために組織中のコ脱系が非活性化され、そのために組織呼吸が障害されるのであろう。無カ血症者の口腔粘膜はカタラーゼを保有していない⁴⁾が、血液中には極く微量のカタラーゼがあり⁵⁾、また methemoglobin-H₂O₂ compound⁶⁾ も H_2O_2 を分解する能力があるため、この障害が進み壊死に至るには、菌力が増大し、 H_2O_2 発生が持続的で多量となる必要があると考えられる。そしてかなり著明な肺炎双球菌、溶連菌等

の細菌感染が起り、初めて組織壊死を来たすのであろう。一旦壊死が起れば、そこは細菌増殖の最適の場所となり、 H_2O_2 の発生は増加し、壊死は進行性となることは想像に難くない。宮本⁷⁾がこの口腔壊疽の治療に、抜歯、持続的な病巣部洗滌、ペニシリン注射が著効を示したと報告しているが、これらの処置により細菌の温床除去および死滅、発生した H_2O_2 の除去を来とし、進行性壊死が止ると考えられる。

第5章 結 語

無カ血症に出現する高原氏病の成因を究明するために、生体内終末呼吸酵素系の中で特に H_2O_2 と親和性の強いコ脱系を選び、 H_2O_2 によるこの酵素系の阻害実験を行なった。すなわちカタラーゼ活性の低いアヒル口蓋粘膜に H_2O_2 注射後のコ脱系の活性度の変化と、マウス肝臓および大腿筋肉、アヒルおよび家兎の口蓋粘膜の各ホモジネートに H_2O_2 を添加した際のコ脱系活性の変化を調べ、次の結果を得た。

1) H_2O_2 注射によりアヒル口蓋粘膜組織中のコ脱系の活性に阻害が認められ、注射回数が増すと阻害程度は著明となつた。

2) 高カタラーゼ値を示す組織ホモジネートと acatalasemic な組織ホモジネートとの H_2O_2 添加によるコ脱系の活性度の比較において、後者に著明なコ脱系活性の阻害が認められた。

3) 各組織ホモジネートに H_2O_2 を添加後放置し、カタラーゼによつて H_2O_2 を分解させると、カタラーゼを保有する組織では、阻害されたコ脱系活性の回復が認められた。それ故 H_2O_2 のコ脱系に対する阻害作用は reversible であることが判明した。一方 NaN_3 によりカタラーゼを不活性化させた組織ホモジネートでは、 H_2O_2 添加1時間後でも回復は認められなかつた。

以上の実験成績より、高原氏病の成因の1つとして、肺炎双球菌、溶連菌等の H_2O_2 産生菌の出す H_2O_2 により、組織中のコ脱系の如き終末呼吸酵素群が阻害され、組織の呼吸が低下し、この状態が持続するうちに壊死が起るものと考えられる。

御指導、御校閲を賜つた恩師緒方教授、高原教授に深謝します。

なお本論文の要旨は第11回日本人類遺伝学会において発表した。

参 考 文 献

- 1) G. H. Hogeboom, W. C. Schneider and G. E. Palade: J. Biol. Chem., 172, 619, 1948.
- 2) 小田:細胞化学シンポジウム, 8, 157, 1958.
- 3) A. Fujita and T. Kodama: Biochem. Z., 232, 20, 1930.
- 4) 三原:岡山医学, 68, 2167, 1956.
- 5) M. Ogata, M. Sadamoto and S. Takahara: Proc. Japan Acad., 42, 828, 1966.
- 6) D. Keilin and E. F. Hartree: Nature, 173, 720, 1954.
- 7) 宮本:岡山医学, 64, 827, 1952.
- 8) M. Sadamoto: Acta Med. Okayama, 20, 193, 1966.
- 9) R. E. Greenfield and V. E. Price: J. Biol. Chem., 220, 607, 1956.
- 10) 戸田:新細菌学.
- 11) 赤堀:酵素研究法, 2, 323.
- 12) M. Dixon and E. G. Webb: Enzymes, 338.
- 13) H. Blaschko: The Bioch. J., 29, 2303, 1935.
- 14) 高原, 大倉:医学のあゆみ, 54, 287, 1965.
- 15) 折田:人類遺伝学雑誌, 7, 163, 1962.
- 16) 緒方他:医学と生物学, 73, 353, 1966.

Experimental Study on the Etiology of Takahara's Disease
(Oral Gengrene appearing in Acatalasemia)

Part 2. Biochemical Study on Effect of Hydrogen Peroxide on the
Oxidative Enzymes (*In vivo* and *in vitro* Experiments)

By

Tooru TAKEHISA

Department of Public Health, Okayama University Medical School
(Director: Profs. Masana Ogata* and Shigeo Takahara**)

With the purpose to know how is the effect of hydrogen peroxide on the succinic dehydrogenase system, experimental studies were conducted using duck, rabbit and mouse.

The results obtained were as follows.

I. *In vivo* study

After injection of hydrogen peroxide in isotonic saline into the palate of ducks, having only a trace amount of catalase in their blood, inhibition of the activity of succinic dehydrogenase system was observed in the homogenate of their palate. Activity of succinic dehydrogenase system in the homogenate of palate of ducks, injected four times, decreased more markedly than that of duck injected ones.

II. *In vitro* Study

1) Activity of succinic dehydrogenase system in the homogenate of duck palate or mouse muscle, containing less amount of catalase, or in the mouse liver homogenate with addition of NaN_3 , decreased more markedly than that of rabbit palate or mouse liver containing more amount of catalase.

2) Activity of succinic dehydrogenase system in the homogenate of the various tissues was decreased by addition of hydrogen peroxide. On the other hand, inhibited activity of succinic dehydrogenase system by hydrogen peroxide recovered as time lapses. From the above findings it is considered that the activity of succinic dehydrogenase system inhibited by hydrogen peroxide is reversible.

Therefore, it seems that the causative factor of the gangrene in acatalasemia cases lies in the fact that so called respiratory enzyme group such as succinic dehydrogenase system in tissue cells, are disturbed by the accumulation of hydrogen peroxide produced from hydrogen peroxide generating micro organisms (hemolytic streptococcus, pneumococcus etc.)

* Department of Public Health. ** Department of Otorhinolaryngology.