

変異マウス血液中のカタラーゼ活性度と メトヘモグロビン濃度の関係

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

小 林 弘 治

昭和61年11月28日受稿

Key words : マウス, カタラーゼ活性度
メトヘモグロビン濃度

緒 言

工業化学物質および環境汚染物質によるメトヘモグロビン血症については、多くの研究¹⁾が行われている。その基礎的研究においてカタラーゼのメトヘモグロビン生成防御機構が問題とされている。即ち、試験管内実験では、人の無カタラーゼ血症血液の過酸化水素によるメトヘモグロビン生成について [折田²⁾]、また人の無カタラーゼ血症の赤血球液に過酸化水素蒸気を暴露した際のメトヘモグロビン生成、およびグルタチオンペルオキシダーゼによるメトヘモグロビン生成に対する防御機構について Ogata³⁾の報告がなされている。さらに、ヘモグロビンの自酸化によるメトヘモグロビン生成に対して血液カタラーゼが抑制するという研究 [Kikuchi⁴⁾]がある。しかしながら、これらの研究は試験管内の研究であり、生体内において、外的因子が加わらない場合の正常時に存在するメトヘモグロビン濃度とそれが何に依存して維持されているかという点についての研究は未だ行われていない。著者は本実験において、アカタラセミア、同型接合体ヒポカタラセミア、ノーマルの三種類の雌雄マウスを用いてメトヘモグロビン生成に対する防御機構およびメトヘモグロビン還元機構について検討し、特に血液カタラーゼ活性度とメトヘモグロビン濃度の相関関係を中心に検討した。また、生体内実験に

関連して試験管内実験としてマウスのアカタラセミア血を過酸化水素に暴露した際のメトヘモグロビン生成度とグルコース添加によるグルタチオンペルオキシダーゼ活性の影響について検討した。

実 験 材 料

5～8週齢、体重25～35gの雄アカタラセミアマウス ($C_3H/AnL C_s^b C_s^b$)、雄同型接合体ヒポカタラセミアマウス ($C_3H/AnL C_s^a C_s^a$)、雄ノーマルマウス ($C_3H/AnL C_s^a C_s^a$)、雌アカタラセミアマウス ($C_3H/Anl C_s^b C_s^b$)、雌同型接合体ヒポカタラセミアマウス ($C_3H/Anl C_s^a C_s^a$)、雌ノーマルマウス ($C_3H/Anl C_s^a C_s^a$)の各マウスの眼窩静脈より採血し抗凝固剤としてヘパリンを用いた。使用したアカタラセミア、ヒポカタラセミアマウスは米国 Oaklidge で放射線照射により作られたもので、米国政府の好意により Feinstein より供与されたものである。

実 験 方 法

1. 溶血液の調整

1-1 メトヘモグロビン濃度測定用溶血液：

採血後、直ちに血液1容に対し50容の溶解試薬 (pH6.8, 0.1Mリン酸緩衝液4容と1% Triton x-100, 6容の混合液)を加えて溶血し使用した。

1-2 血液カタラーゼ活性度測定用溶血液：

アカタラセミアマウスの血液は蒸留水で10倍希釈、ヒポカタラセミアマウスの血液は100倍希釈、ノーマルマウスの血液は250倍希釈して用いた。

1-3 グルタチオンペルオキシダーゼ活性度測定用溶血液：

血液を2.5%クエン酸ナトリウムを含む5%ポリビニルピロリドンの5倍容量中に集め、遠沈分離した赤血球を冷生食水で3回洗浄後、1容の赤血球に冷蒸留水4容を加えて、凍結水解を3回繰り返して溶血し、終濃度を考慮して等容のDrabkin 試薬2倍強度液(1.6 mM KCN, 1.2 mM $K_3Fe(CN)_6$, 23.8 mM $NaHCO_3$)を混合し、試料溶液とした。

1-4 NADH ジアフォラーゼ活性度測定用溶血液：

血液を pH7.3, 0.1 M リン酸緩衝液-生食水で洗浄後、赤血球を亜硝酸ナトリウム-生食水でメトヘモグロビンとし、リン酸緩衝液-生食水で充分洗浄後、処理赤血球1容に対し蒸留水19容を加えて溶血し、3,000回転で7分間遠沈分

離を行い不溶成分を除去し、この上清を測定用血液として用いた。

2. 測定方法

2-1 メトヘモグロビン濃度の測定 (図1)：

メトヘモグロビン量および総ヘモグロビン量は、Van Kampen 法⁵⁾で行った。

- 1) 血液0.2 mlを溶解試薬10.0 mlに溶かし、その3.0 mlを1.0 cmセルに入れ、630 nmで吸光度を測定する(E_1)。5% KCN 40 μ lを加えて2分後同じ波長で測光する(E_2)。
- 2) 残りの約7 mlの溶血液に、5% $K_3Fe(CN)_6$ 40 μ lを加え5分後3.0 mlをセルに取り測光して(E_3)、さらにKCN 40 μ lを加え2分反応後再度測光する(E_4)。

注) E_2 , E_3 , E_4 は E_1 同様吸光度を示す。

- 3) 総ヘモグロビン量は、(E_4)の測定を終えた溶液を蒸留水で5倍希釈して541 nmで吸光度を測定し、標準液で作った検量線から求めた。

4) 計算

$$\frac{\text{メトヘモグロビン量}}{\text{総ヘモグロビン量}} (\%) = \frac{E_1 - E_2}{E_3 - E_4} \times 100$$

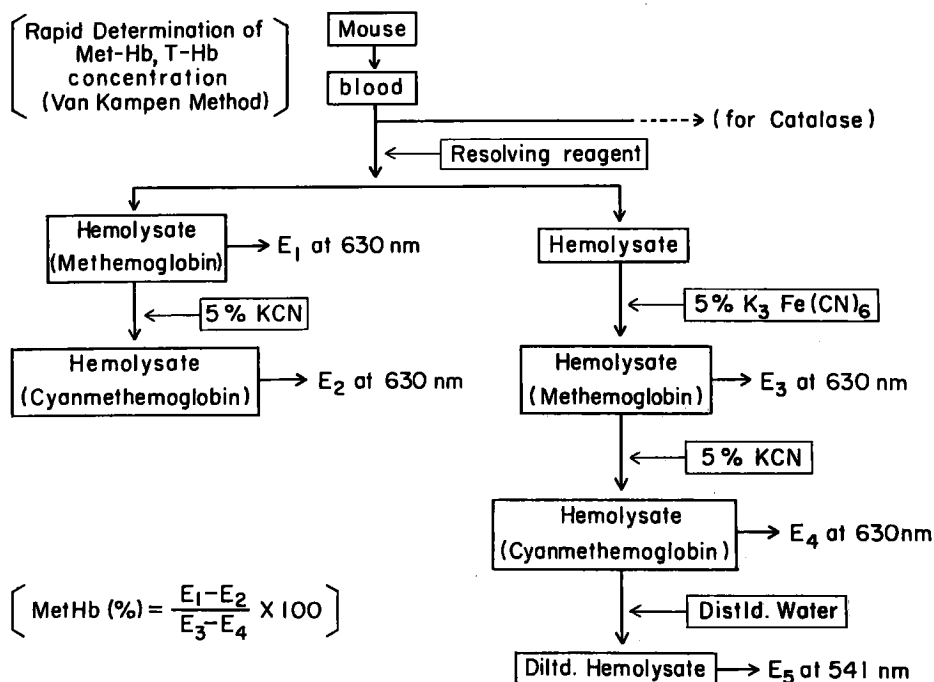


Fig.1 Procedure of determining methemoglobin and total hemoglobin concentration in the blood

2-2 血液カタラーゼ活性度の測定 (図2) :
血液カタラーゼ活性度は, Feinstein⁶⁾の過ホウ素酸法により測定した.

1) 試験管内に1.5%過ホウ素酸塩液3.2mlとpH6.8リン酸緩衝液0.6mlを加え, 20°Cと37°Cの2種の温度で保温しながら, 盲検用には蒸留水を0.2ml, その他には血液試料0.2mlを加えて5分間反応させた後, 三塩化酢酸と2N硫酸混合液4mlを加えて反応を停止する.

2) 反応後の液を0.05N過マンガン酸カリウム溶液で滴定する.

3) 計算:

$$\text{血液カタラーゼ活性度 (Perborate Unit/g Hb)} = \frac{0.05 \times f \times (b-x) \times c \times t}{\frac{\text{Hb}}{100}}$$

f: 過マンガン酸カリウム溶液の力価

b: 盲検用の滴定量

x: 試料の滴定量

c: 酵素液量を1mlに換算する係数

t: 希釈倍数

Hb: 総ヘモグロビン定量値

2-3 グルタチオンペルオキシダーゼ活性度の測定 (図3):

Pagliaらの方法⁷⁾で測定した.

1) pH7.0, 0.05Mリン酸緩衝液2.58ml, 0.15M GSH 0.1ml, 1.125M NaN, 0.01mlを1.0cmセルに取り, 8.4mM NADPH 0.1ml, GSSG-R 0.01ml, 血液試料0.1mlおよび2.2mM過酸化水素0.1mlを加え攪拌して反応を開始させ, 反応開始後2~4分間の間の340nmにおける吸光度の変動を測定する. 盲検用には血液試料の代りに蒸留水を用いて行う.

2) 計算:

反応開始後2分と4分の吸光度 E_2, E_4 から次式により求める.

グルタチオンペルオキシダーゼ活性度 ($\mu\text{moles NADPH/min} \cdot \text{gHb}$)

$$= \frac{(E_2 - E_4) - \text{盲検値}}{12.44 \times \text{Hb (g)}}$$

2-4 NADH ジアフォラーゼ活性度の測定 (図4):

NADH ジアフォラーゼ活性度は Scott らの方法⁸⁾を, 改変した三輪の方法⁹⁾で測定した.

1) 蒸留水 (盲検用では2.78ml, 測定用では3.25mgメトヘモグロビンに相当する液量を, 2.78mlから減じた量)を1.0cmセルに取り, pH7.55, 1Mトリス緩衝液0.05ml, 0.01M EDTA-2Na溶液0.10mlおよび溶血液 (測定用に3.25mgメトヘモグロビンに相当する液量)を加え25°CでDBI (2.6-ジクロロベ

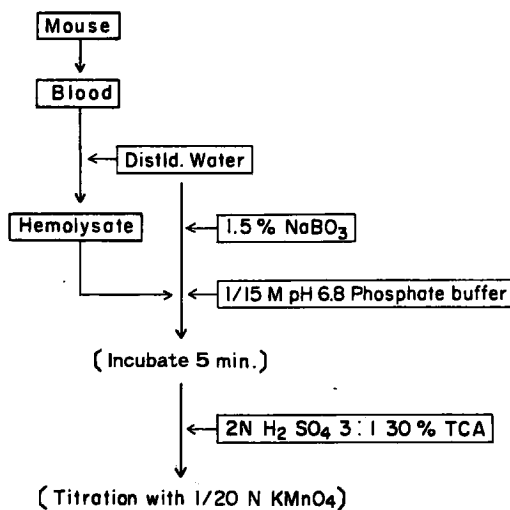


Fig. 2 Procedure of determining catalase activity in the blood (Perborate method by Feinstein⁶⁾)

ンゼノンインドフェノール) 水溶液 0.05 ml, NADH₂ 0.02 ml を加え混和して反応を開始し, 600 nm で吸光度の減少を20分間記録する。

2) 計算:

原著では, 3.25 mg/3 ml のメトヘモグロビンを含むときの毎分当りの吸光度を求めているが, 三輪の方法により 1 g/ml のメトヘモグロビンの毎分当りの吸光度の減少を求める単位とした。

NADH ジアフォラーゼ活性度 ($\Delta OD/min/MetHb\ g/ml$)

$$= \frac{(\text{試料の吸光度の差}) - (\text{盲検用の吸光度の差})}{20 \times 3.25 \times 3}$$

2-5 マウス赤血球の過酸化水素暴露によるメトヘモグロビン生成

試験管内でアカタラセミアマウス赤血球の過酸化水素によるメトヘモグロビン生成量をノーマルマウス赤血球のそれと比較した。併せてグルコース添加によるメトヘモグロビン生成に対するグルタチオンペルオキシダーゼ抑制作用の推定を行った。

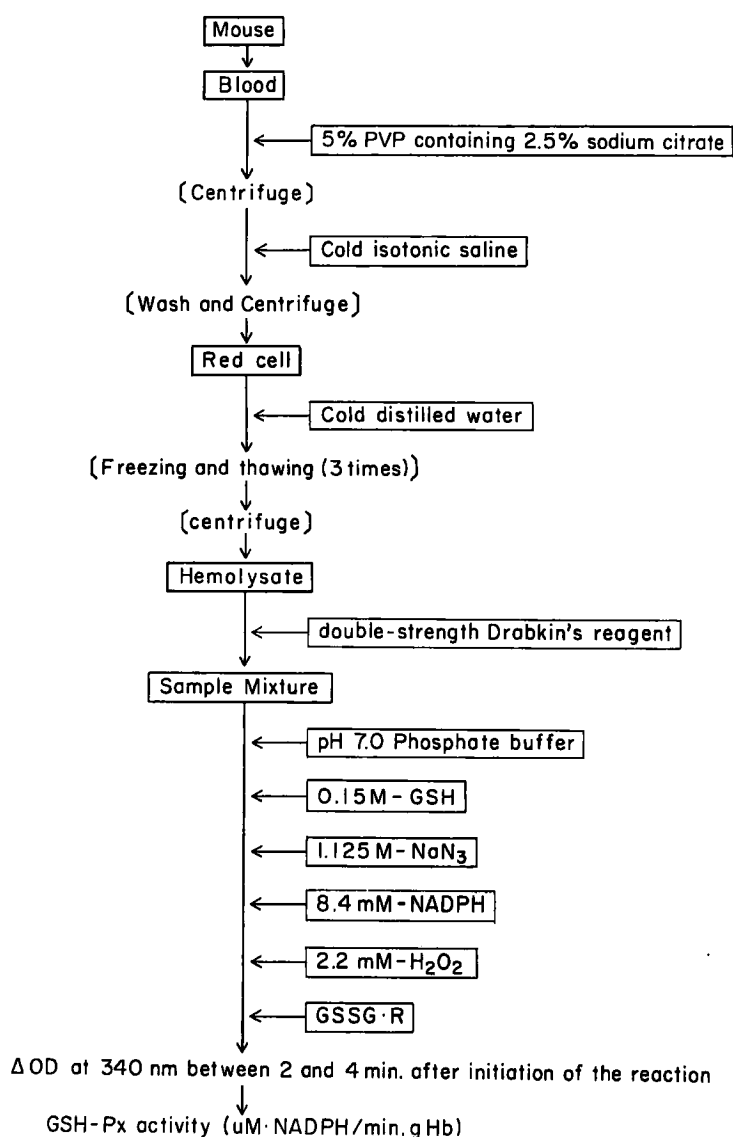


Fig. 3 Procedure of determining GSH-Px activity in the blood

1) 採血後、遠沈分離を行い赤血球を生食水で3回洗浄したものを用いた。

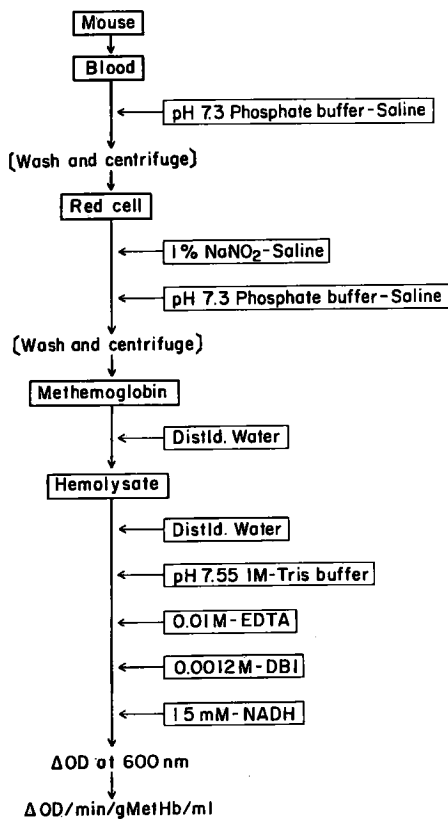


Fig. 4 Procedure of determining NADH diaphorase activity in the blood

2) Warburg フラスコに生食水 4 ml, 赤血球懸濁液 0.5 ml, 20×10 mM グルコース 0.5 ml を加えた。(グルコース無添加のものは, 生食水 4.5 ml とした。) Warburg フラスコの側管に 30% 過酸化水素 0.25 ml を加え, フラスコはパラフィルムで封鎖し, 37°C で振盪した。30分, 90分, 130分反応後に試料 0.6 ml を採取し, 溶解液 2.4 ml で溶血し, メトヘモグロビン濃度を測定した。

実験結果

1. アカタラセミア, ヒポカタラセミア, ノーマルマウスの血液カタラーゼ活性度および三種マウスのメトヘモグロビン濃度のマウス相互間の差異:

アカタラセミア, ヒポカタラセミア, ノーマルの三種類の雌雄マウスから得た血液について, カタラーゼ活性度とメトヘモグロビン濃度を測定した。結果は(表1)に示す。またメトヘモグロビン濃度についてマウス相互間の有意差検定を行い(表2)の結果を得た。

血液カタラーゼ活性度:(表1), (表2)より雌ノーマル>雄ノーマル>雄ヒポカタラセミア>雌ヒポカタラセミア>雄アカタラセミア>雌アカタラセミアの順に高かった。この三種のマウスの血液カタラーゼ活性度の性差は, Feinstein

Table 1 Catalase activity and methemoglobin concentration in the hemolysates of normal, homo-hypocatalasemic and acatalasemic mice (mean±standard deviation)

	Sex	catalase (PU/gHb)	methemoglobin [(MetHb/Hb) × 100]
Normal mice	male	844.0 ± 127.9	0.85 ± 0.26
	female	850.1 ± 70.1	0.77 ± 0.27
	total	847.3 ± 98.1	0.81 ± 0.26
Homo- Hypocatalasemic mice	male	268.4 ± 35.0	1.09 ± 0.07
	female	211.3 ± 80.4	1.20 ± 0.18
	total	237.3 ± 67.9	1.15 ± 0.14
Acatlasemic mice	male	52.3 ± 7.4	1.52 ± 0.16
	female	19.1 ± 4.5	1.73 ± 0.17
	total	32.8 ± 17.8	1.64 ± 0.19

Table 2 Difference in methemoglobin concentration between two independent mouse groups

	fm.A	m.A	fm.H	m.H	fm.N	m.N
fm.A		*	**	**	**	**
m.A			**	**	**	**
fm.H				-	**	*
m.H					*	-
fm.N						-
m.N						-

m=male, fm=female, A=acatalasemic mice, H=homo-hypocatalasemic mice, N=normal mice, * : $p < 0.05$, ** : $p < 0.01$, - : $p > 0.05$

ら¹⁰⁾の結果とよく一致していた。

メトヘモグロビン濃度：雌アカタラセミア > 雄アカタラセミア > 雌ヒポカタラセミア > 雄ヒポカタラセミア > 雄ノーマル > 雌ノーマルの順に高かった。そして血液カタラーゼ活性度と逆の順序を示した。

またメトヘモグロビン濃度については、性別間（雌アカタラセミアと雄アカタラセミア間）および種別間（アカタラセミア、ヒポカタラセミアおよびノーマル間）に有意な差があることが認められた。

2. 血液カタラーゼ活性度（常用対数値）とメトヘモグロビン濃度の相関関係

アカタラセミア、ヒポカタラセミア、ノーマルの三種類の雌雄マウスの血液カタラーゼ活性度の常用対数値とメトヘモグロビン濃度との相関関係を（図5）に示す。

両者間には直線関係が認められ、血液カタラーゼ活性度が増加するにつれて血液中のメトヘモグロビン濃度比が減少しているのが認められた。そして血液カタラーゼ活性度の常用対数値 ($x : \log \text{Pu/gHb}$) とメトヘモグロビン濃度比 [$y : (\text{Met Hb}/\text{T} \cdot \text{Hb}) \times 100$] の間には負の相関関係 ($r = -0.88$) が存在し、一次回帰式 $y = -0.556x + 2.45$ を示した ($n = 45$)。そして t 検定により 0.1% 以下の危険率で母相関係数が零の仮定は否定された。

この成績は、Feinstein の原法⁶⁾ に従って 37°C で 5 分間測定した血液カタラーゼ活性度であるが、一方 Aebi ら¹¹⁾ はアカタラセミアマウスの

血液カタラーゼ活性度を 20°C で 5 分間測定すると、37°C で 5 分間測定した値よりも高いことを報告している。この点より過ホウ素酸法において血液カタラーゼ活性度を 20°C と 37°C の 2 種の温度で測定した。その結果 20°C での測定値は、37°C で測定した値の、それぞれアカタラセミアで 2.13 ± 0.15 、ヒポカタラセミアで 1.21 ± 0.03 、ノーマルで 1.09 ± 0.06 倍の値を示した。この事実を用いて（図5）の成績を 20°C のカタラーゼ測定法に換算したものを（図6）に示した。即ち、20°C の測定値による活性度の常用対数値 (x) とメトヘモグロビン濃度 (y) の間の相関関係を調べた結果、相関係数 $r = -0.87$ でよい相関が認められ、その際の一次回帰式は、 $y = -0.675x + 2.82$ を示した。そして t 検定により 0.1% 以下の危険率で母相関係数が零の仮定は否定された。

3. 血中メトヘモグロビンレベルに影響する血液カタラーゼ以外の酵素の活性度

グルタチオンペルオキシダーゼ活性度：雄アカタラセミアマウスは $10.00 \pm 0.76 \text{ NADH} \cdot \mu\text{moles}/\text{min gHb}$ 、雄ノーマルマウスは 10.54 ± 0.63 で、両者間には有意差は認められなかった。（表3）

NADH ジアフォラーゼ活性度：雄アカタラセミアマウスは、 $2.19 \pm 0.47 \Delta\text{OD}/\text{min}/\text{Met Hb} \cdot \text{g/ml}$ 、雌アカタラセミアマウスは 2.14 ± 0.29 、雄ノーマルマウスは 2.37 ± 0.45 、雌ノーマルマウスは 2.20 ± 0.17 でそれぞれの間に有意差は認められなかった。

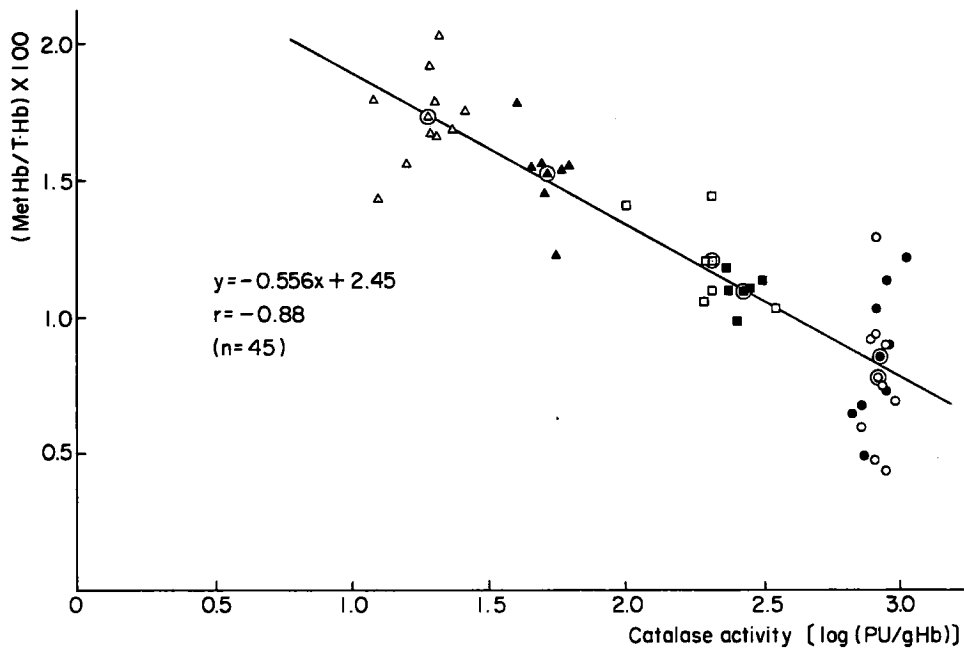


Fig. 5 Correlation between logarithm of catalase activity and methemoglobin concentration (37°C)

Normal mice (♂ : ●, ♀ : ○), homo-hypocatalasemic mice (♂ : ■, ♀ : □)
acatalasemic mice (♂ : ▲, ♀ : △)

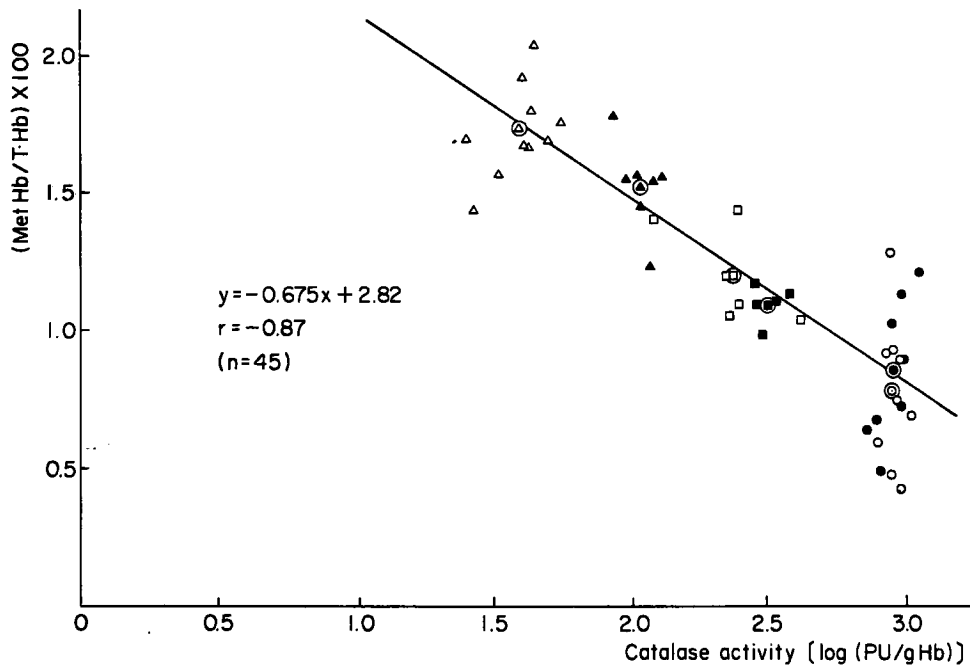


Fig. 6 Correlation between logarithm of catalase activity and methemoglobin concentration (20°C)

Normal mice (♂ : ●, ♀ : ○), homo-hypocatalasemic mice (♂ : ■, ♀ : □)
acatalaemic mice (♂ : ▲, ♀ : △)

Table 3 Glutathione peroxidase activity in the hemolysates of normal mice and acatalasemic mice

mice	Glutathione peroxidase (NADPH.μmoles/min gHb)
Normal mice	10.54 ± 0.63
Acatalasemic mice	10.00 ± 0.76

Table 4 NADH diaphorase activity in the hemolysates of normal and acatalasemic mice

mice	Sex	NADH diaphorase (Δ OD/min/MetHb.g/ml)
Normal mice	male	2.37 ± 0.45
	female	2.20 ± 0.17
Acatalasemic mice	male	2.19 ± 0.47
	female	2.14 ± 0.29

4. 試験管内におけるマウス赤血球液の過酸化水素暴露によるメトヘモグロビン生成:

(図7)に示すように、アカタラセミアマウスの赤血球はグルコース無添加の状況においてノーマルマウス赤血球に比べて明らかにメトヘモグロビン生成速度の早いことが認められた。従って試験管内における過酸化水素によるメトヘモグロビン生成は血液カタラーゼによって抑制されていることが認められた。

また、アカタラセミアマウス赤血球およびノーマルマウス赤血球共にグルコースを添加したものにはメトヘモグロビン生成の抑制が認められた。このことは赤血球内に存在するグルタチオンペルオキシダーゼの作用によるものと考えられる。しかし、グルコースの存在下、即ちグルタチオンペルオキシダーゼ作用下においても、アカタラセミアマウスのメトヘモグロビン生成量はノーマルマウスに比べて多かった。

総括並びに考案

正常時メトヘモグロビンレベルとメトヘモグロビン血症:

赤血球は酸素を運搬する作用をもつ細胞であ

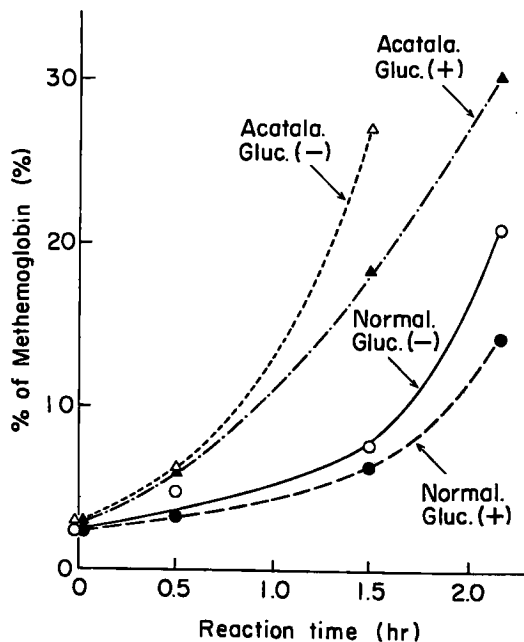


Fig. 7 Effect of hydrogen peroxide on methemoglobin content in normal and acatalasemic red cells incubated with or without glucose

り、且つ酸化、還元の活発な細胞であるといわれている。正常赤血球のメトヘモグロビン量は極めて低いといわれ、Bodansky¹²⁾によればガス分析法では全ヘモグロビン量の1~2%、cyanide-spectrophotometryによる測定では0~2.4%であったと報告している。これは赤血球中にメトヘモグロビン生成に対する防御機構として、カタラーゼ、グルタチオンペルオキシダーゼが過酸化水素を酵素的に分解除去する事実およびメトヘモグロビン還元機構としてNADH ジアフォラーゼなどの酵素的還元に加え、アスコルビン酸、還元型グルタチオンなどの非酵素的還元機構が存在するためである。一方、遺伝的にメトヘモグロビン血症を起こす疾患として、①遺伝性メトヘモグロビン血症、②HbM症がある。遺伝性メトヘモグロビン血症は、メトヘモグロビン還元酵素の欠損によって起こり、HbM症は、ヘモグロビンを構成するタンパク分子の構造の変異によって起こる。例えばHbM_{Iwate}は α 鎖の87番目のヒスチジンがチロジンに変化したものであり、HbM_{Boston}は α 鎖の58番目のヒスチジンがチロジンに変化したものである¹³⁾。以下、各項に従って述べる。

メトヘモグロビン生成に対する防御機構：

血液カタラーゼ：(人の試験管内実験) 過酸化水素に対する防御機構には、血液カタラーゼが考えられる。折田²⁾は、日本人の無カタラーゼ血症血液に過酸化水素を作用させた時のメトヘモグロビン生成の割合は、正常人の血液に作用させた場合よりも大きかったと述べており、過酸化水素の分解に血液カタラーゼが重要な役割を果たしていることを示唆している。また、Aebi¹⁴⁾もスイス人の無カタラーゼ血症血液で、同様の結果を報告している。また、血液カタラーゼの重要性について国分¹⁵⁾は、日本人の無カタラーゼ血症血液にヒドロキシルアミンを作用させてハインツ小体の形成を認め、血液カタラーゼの作用が抑制または不活性化された場合に血球成分の酸化変性から起こると述べている。

(マウスの試験管内実験) 著者は、マウス赤血球に過酸化水素を暴露してメトヘモグロビン生成を時間経過によって調べた。その結果アカタラセミアマウスの赤血球はノーマルマウスの赤

血球よりもメトヘモグロビン生成速度が早いことが認められた。このことは過酸化水素によって赤血球中にメトヘモグロビンが生成し、赤血球中のカタラーゼがこれを抑制するという事実を実証する事実である。

(生体内実験) 著者は、カタラーゼ活性の異なるアカタラセミア、同型接合体ヒポカタラセミア、ノーマルの三種類の雌雄マウスから得た血液についてカタラーゼ活性およびメトヘモグロビン濃度を測定した。その結果、マウス血中のメトヘモグロビン濃度は、雌アカタラセミア、雄アカタラセミア、雌ヒポカタラセミア、雄ヒポカタラセミア、雄ノーマル、雌ノーマルの順序に減少した。この順序は血液カタラーゼ活性度と逆の順序を示した。そして血液カタラーゼ活性度の対数値とメトヘモグロビン濃度間に有意な負の相関関係を有することが認められた。このことは、正常血中のメトヘモグロビン濃度は、血液カタラーゼによっても支配されていることを示している。

グルタチオンペルオキシダーゼ：血液カタラーゼ以外の過酸化水素に対する防御機構として、マウス血液中のグルタチオンペルオキシダーゼ活性度の測定を行い、アカタラセミアマウスとノーマルマウス間に有意差は認められなかった。この成績は、血中メトヘモグロビン濃度の増加は主として血液カタラーゼによって抑制されていることを生体内実験で確認したものである。

また試験管内実験で、マウス赤血球液にグルコース添加時および無添加時に、過酸化水素を暴露してメトヘモグロビン生成を時間経過によって調べた成績では、グルコースの存在下では、アカタラセミアマウス、ノーマルマウスの両赤血球ともにグルコース無添加に対してメトヘモグロビン生成が抑制された。この結果は、グルコース添加により赤血球内にNADPHが増加し、グルタチオン還元酵素が作用して酸化型グルタチオンより還元型グルタチオンが生じ、グルタチオンペルオキシダーゼによる過酸化水素の消失がおこるためであり¹⁶⁾、この結果から、メトヘモグロビン生成に血液カタラーゼのみでなくグルタチオンペルオキシダーゼも作用している事実が推定される。またグルコース添加例で、

アカタラセミアマウス赤血球のメトヘモグロビン生成量が、ノーマルマウス赤血球に比べて多いことは、グルタチオンペルオキシダーゼ作用下においても、血液カタラーゼの欠損によるメトヘモグロビン生成を完全に抑制することはできないということを示している。即ち、*in vivo* におけると同様に血液カタラーゼがメトヘモグロビン生成を抑制することは、*in vitro* においても同様と考えられる。人赤血球の試験管内実験において Ogata³⁾ は、無カタラーゼ血症患者の赤血球懸濁液を使用し、Azide およびグルコース添加有無の場合の過酸化水素によるメトヘモグロビン生成について検討し、メトヘモグロビン生成の抑制は血液カタラーゼ活性度に強く依存し、さらにグルタチオンペルオキシダーゼも若干の抑制効果のあることが認められたと報告している。

SOD: Sutton¹⁷⁾ の⁶⁰Cobalt による照射実験で示すように生成するスーパーオキシドアニオンによって赤血球内でメトヘモグロビン生成が起こるが、この生成は SOD と血液カタラーゼによって分解除去され、メトヘモグロビン生成は抑制されている。

なお SOD 活性については、Noda¹⁸⁾ はアカタラセミアマウスはノーマルマウスに比べ約 10% 増加していたと報告している。メトヘモグロビン生成に関しては SOD が関与しているとすれば、アカタラセミアマウスのノーマルマウスより高い血中 SOD は血中メトヘモグロビン濃度を抑制する方向に作用していると推定されるが、今後さらに検討の必要があると思われる。

メトヘモグロビン還元機構:

赤血球が酸化されるとメトヘモグロビンが生成されるが、メトヘモグロビンを還元して赤血球を正常に保つ系が存在する。Scott¹⁹⁾ は生成したメトヘモグロビンの還元作用の強さを比較し、その寄与の程度は NADH ジアフォラーゼ (73%)、アスコルビン酸 (12%)、還元型グルタチオン (9%)、その他の還元酵素 (6%) と述べている。また Schwarts²⁰⁾ は、メトヘモグロビン量は遺伝性メトヘモグロビン血症により示されるように NADH ジアフォラーゼ活性度に依存すると述べている。しかしながら本研

究では NADH ジアフォラーゼ活性度は、アカタラセミアマウス、ノーマルマウス間に有意差は認められず、アカタラセミアマウスのメトヘモグロビン量がノーマルマウスより多い事実 NADH ジアフォラーゼが関係しているとは考えられなかった。

正常時メトヘモグロビンレベルとメトヘモグロビン血症の生成のバックグラウンドレベルに関する考察:

以上の成績より、血液カタラーゼ以外のメトヘモグロビン生成に対する防御機構およびメトヘモグロビン還元機構が正常レベルである場合には、生体内の正常時に存在するメトヘモグロビン濃度は、血液カタラーゼ活性度に強く依存して抑制されていることが認められた。従ってノーマルマウスに比べ、アカタラセミアマウスおよびヒポカタラセミアマウスに工業化学物質である *ortho*-Aminophenol あるいは NO_x を作用させた場合にメトヘモグロビン生成の起こりやすい事実は、血液カタラーゼの欠損あるいは低下により無作用の時すでにメトヘモグロビン濃度の恒常性が乱されており、メトヘモグロビン生成物質の作用しやすい準備状態であると考えられる。今後さらに *ortho*-Aminophenol, NO_x によるメトヘモグロビン生成に関して研究が行われ、両者の関係が明らかにされるものと考えられる。

結 論

カタラーゼ活性の異なるアカタラセミア、同型接合体ヒポカタラセミア、ノーマルの三種類のマウスから得た血液について、カタラーゼ活性度及びメトヘモグロビン濃度を測定し、メトヘモグロビンレベルに関係する酵素としてグルタチオンペルオキシダーゼ及び NADH ジアフォラーゼ活性度を測定した。また試験管内でマウスの赤血球にグルコース添加、無添加の条件下で、過酸化水素によるメトヘモグロビン生成量を測定し、以下の結果を得た。

1. マウス血液中のメトヘモグロビン濃度は雌アカタラセミア、雄アカタラセミア、雌同型接合体ヒポカタラセミア、雄同型接合体ヒポカタラセミア、ノーマルの順に減少し、この

順序は、血液カタラーゼ活性度と逆の順を示した。そしてメトヘモグロビン濃度は、性別間（雌アカタラセミアと雄アカタラセミア間）および種別間（アカタラセミア、ヒポカタラセミアおよびノーマル間）に有意な差のあることが認められた。

2. 血液カタラーゼ (E.C. 1. 11. 1. 6) 活性度（常用対数値）とメトヘモグロビン濃度の間に有意な負の相関が認められた。
3. メトヘモグロビンレベルに関係する酵素の活性度の検討を行い、グルタチオンペルオキシダーゼ (E.C. 1. 11. 1. 9) および NADH ジアフォラーゼ (E.C. 1. 6. 4. 3) の活性度についてはアカタラセミアマウスとノーマルマウスの間有意差は認められなかった。

4. 試験管内でマウスの赤血球液に過酸化水素を暴露した時の、メトヘモグロビン生成量はグルコース添加時、無添加時いずれにおいてもアカタラセミアマウスはノーマルマウスよりも多かった。また、アカタラセミアマウスおよびノーマルマウス赤血球ともに、グルコース無添加時のメトヘモグロビン生成速度は添加時に比べ速かった。

5. 以上の成績より、正常時に存在する血中メトヘモグロビン濃度は血液カタラーゼ活性度に依存していることが認められた。

謝 辞

稿を終わるに臨み、御懇篤なる御指導と御校閲を賜った緒方正名教授に深甚なる謝意を表します。

文 献

1. 渡辺 烈：メトヘモグロビン血症，毒性学—その生化学的側面，吉村英敏編，講談社，東京（1979）pp 225—238.
2. 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（1962）7，163—189.
3. Ogata M, Takahisa T, Mizugaki J and Takahara S : Glutathione peroxidase in the red cells of Japanese acatalasemic blood. *J Human Genet* (1975) 19, 325—333.
4. Kikuchi G, Shukuya R and Suzuki M : On the mechanism of the activation of molecular oxygen by hemoglobin. *J Biochem* (1955) 42, 267—284.
5. Van Assendelft OW : Spectrophotometry of Haemoglobin Derivatives. Royal Vangorcum Ltd., Assen Netherland (1970).
6. Feinstein RN : Perborate as substrate in a new assay of catalase. *J Biol Chem* (1949) 180, 1197—1202.
7. Paglia DE and Valentine WN : Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* (1967) 70, 158—169.
8. Scott EM : The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. *J Clin Invest* (1960) 39, 1176—1179.
9. 三輪史朗：臨床検査（1971）15(12), pp 133—134.
10. Feinstein RN, Braun JT and Howard JB : Acatalasemic and hypocatalasemic mouse mutants II. Mutational variations in blood and solid tissue catalases. *Arch Biochem Biophys* (1967) 120, 165—169.
11. Aebi H, Suter H and Feinstein RN : Activity and stability of catalase in blood and tissues of normal and acatalasemic mice. *Biochem Genet* (1968) 2, 245—251.
12. Bodansky O : Methemoglobinemia and methemoglobin producing compounds. *Pharmacol Rev* (1951) 3, 144—196.
13. Winslow RM and Anderson WF : The hemoglobinopathies, the Metabolic Basis of Inherited Disease, Stanbury, Wyngaarden and Fredrickson eds, McGraw-Hill Book Co. NY (1978)

pp 1487-1489.

14. Aebi H, Baggiolini M, De Wold B, Lanber E, Suter E, Micheli A and Fleis J : Observation in two Swiss families with acatalasia II. *Enzymol Biol Clin* (1964) **4**, 121-151.
15. 国分 統 : 緒種耳鼻咽喉科領域疾患及び無カタラーゼ血液症における Heinz 小体の臨床的並びに実験的研究. *岡山医学会雑誌* (1959) **71**, 2755-2768.
16. 三輪史朗 : 溶血性貧血, 遺伝生化学 II, 荻田善一編, 中山書店, 東京 (1974) pp 321-325.
17. Sutton HC, Roberts PB and Winterbourn CC : The rate of reaction of superoxide radical ion with oxyhaemoglobin and methaemoglobin. *Biochem J* (1976) **155**, 503-510.
18. Noda Y, Narumiya S, Takai K and Hayaishi O : Superoxide dismutase activity in acatalasemic erythrocytes ; in *Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen* Hayaishi and Asada eds, University of Tokyo Press, Japan (1977) pp 293-297.
19. Scott EM, Duncan IW and Ekstrand V : Reduction of methemoglobin. *Fed Proc* (1963) **22**, 467.
20. Schwartz JM and Jaffe ER : Hereditary Methemoglobinemia with Deficiency of NADH Dehydrogenase, the Metabolic Basis of Inherited Disease, Stanbury, Wyngaarden and Fredrickson eds, McGraw-Hill Book Co. NY (1978) pp 1452-1463.

**Relationship between catalase activity and methemoglobin
concentration in the blood of acatalasemic, homozygous
hypocatalasemic and normal mice.**

Hiroharu KOBAYASHI

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama

(Director : Prof. M. Ogata)

Correlations between catalase activity and the methemoglobin concentration in the blood of acatalasemic, homozygous hypocatalasemic and normal mice were investigated. The formation of methemoglobin by hydrogen peroxide in the red cells with or without the addition of glucose *in vitro* was also studied. Levels of methemoglobin concentrations in the blood were decreased in the order of female acatalasemic, male acatalasemic, female homozygous hypocatalasemic, male homozygous hypocatalasemic and normal mice. A good negative correlation were observed between the logarithm of catalase activity and methemoglobin concentration in the blood of acatalasemic, homozygous hypocatalasemic and normal mice. No significant differences in glutathione peroxidase activity and NADH diaphorase activity among acatalasemic and normal mice were observed. The amount of methemoglobin formed by hydrogen peroxide from hemoglobin in acatalasemic mouse red cells with or without the addition of glucose was more than that in normal mouse red cells. The amount of methemoglobin in normal or acatalasemic mouse red cells without the addition of glucose was more than that in red cells with the addition of glucose. From the above results, the methemoglobin concentration appears to be mainly controlled by the blood catalase activity.