

## 赤血球グルタチオン還元酵素測定の実際面に おける諸問題の検討

川崎医科大学 内科  
八幡義人  
(昭和59年9月20日受付)

### Studies on Several Practical Problems in Determination of Red Cell Glutathione Reductase Activity

Yoshihito Yawata  
Department of Medicine, Kawasaki Medical School  
(Accepted on September 20, 1984)

ヒト赤血球グルタチオン還元酵素 (GR) の測定の実際に関する諸問題点, 特に, 標品としての洗滌赤血球及び溶血液の調製, 自動記録装置を備えた光電比色上の問題点, 酵素活性に及ぼす基質, 補酵素, 反応液 pH, FAD による活性化などについて検討した. また本酵素の Michaelis 定数を基質 (GSSG) 及び補酵素 (NADPH) について検討し, あわせて, 成人及び新生児の赤血球 GR 活性について, 正常値を設定した.

Several practical problems in the determination of glutathione reductase (GR) activity in human red cells were studied, such as processing washed red cells and hemolysates for crude enzyme preparation, performing spectrophotometry with an automatic recorder, and dealing with several factors affecting the GR activity. Michaelis constants of red cell GR for oxidized glutathione (GSSG) or for reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) were determined. Normal values of GR activity were established in red cells of normal adults and of normal newborn babies in the Japanese population.

Key Words ① Red cell glutathione reductase  
② Flavin adenine dinucleotide

#### I 緒 言

赤血球諸酵素のうち, 解糖系関連酵素については, 多くの研究がなされており, 臨床的にも, 各種の溶血性貧血症例において, これらの酵素欠損が発見され, その溶血病態の研究が進んでいる.<sup>1)~4)</sup> これに対して, 五炭糖リン酸回路系 (HMPS) については, glucose-6-

phosphate dehydrogenase (G-6-PD) 以外の諸酵素については, 今後の研究に俟つ所が少なくない. 赤血球の酸化還元系には, HMPS系を含めて, グルタチオン代謝系の関与が重要視されている. このうち, 特に還元型グルタチオン (GSH) は, -SH 基物質として, 抗酸化作用が期待され, 赤血球 Hb, 膜蛋白などの機能保持に不可欠と考えられている.<sup>5)6)</sup> この点 赤血

球内 GSH 濃度が、生体内の他の臓器に比較すると、非常に高い (70~100 mg/dl RBC) ことがこれを裏付けている。

ところで、この GSH は、2つの経路、即ち de novo 合成系あるいは、酸化型グルタチオン (GSSG) からの再生系、いずれかに産生系が依存している。後者はグルタチオン還元酵素 (glutathione reductase: GR) による酵素反応によっている。<sup>7)</sup> そこで、この GR 活性が生体代謝系、特に酸化・還元系に有する意義が注目される。<sup>8)~12)</sup> 本論文では、この GR について、その活性測定、その性状及び病態について、実験的、及び総合的検討を加えたので報告する。

## II 方 法

赤血球 GR 活性の測定には、静脈採血によって得られた全血から、まず洗滌赤血球を調整し、<sup>13)</sup> これを粗酵素標品として、酸化型グルタチオン (GSSG) を基質に、還元型ピリジヌクレオチドである NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate) を指標として、分光学的に測定した。

### (1) 洗滌赤血球浮遊液の調製

静脈血を抗凝固剤 (ヘパリン, EDTA いずれでもよい) にて採取し、3000 rpm, 20分間遠心操作によって、血漿および buffy coat を除去した。赤血球分画1容に対して10容の生理的食塩水にて3回洗滌後、ヘマトクリットを30%に調製し、洗滌赤血球浮遊液を得た。この浮遊液について、(1) 赤血球数、(2) Hb 濃度、(3) Ht 値、(4) 網赤血球数を各々算定した。

次に血漿の関与については、GR活性のうち、非活性型 GR は FAD の存在によって、活性型 GR となるため、<sup>8)9)12)</sup> 血漿除去が不十分であると、血漿中に存在する FAD によって、非活性型 GR の活性値が正確に測定出来ない可能性がある。しかし、正常ヒト血漿中の FAD 値は幸いにも、赤血球 FAD 濃度 ( $17.3 \pm 2.9 \mu\text{g}\%$ ) に比較して、かなり低く ( $2.4 \pm 0.3 \mu\text{g}\%$ )、<sup>12)</sup> 上述のような洗滌操作を行うことによって、血漿

FAD は十分除去され、実際には問題とはならなかった。

採血後、直ちに洗滌赤血球浮遊液を作成し、次に述べる GR 活性の測定を行った。しかし、止むを得ず、赤血球保存を行う必要が生じた場合、及び暫時 GR 活性測定を延期しなければならぬ場合には、洗滌赤血球浮遊液を調製後に 4°C 保存するよりも、むしろ 1~2 日間であれば、全血のまま (血漿中にグルコースが存在する条件下で) 4°C 保存することとした。洗滌赤血球浮遊液を検体として使用する場合には、むしろ直ちに溶血液を調製して、これを -80°C にて凍結保存した。少なくとも数週間は GR 活性に変動は認められなかった。

### (2) GR 活性の測定

GR 活性は原法<sup>14)</sup> の一部変更によって行った。また、他法<sup>8)15)</sup> についても一部比較検討を行った。

### (3) GR 測定試薬の調製 (Long and Carson 法)

#### (A) EDTA-Tris 緩衝液 (pH 7.6).

EDTA (2 Na 塩): 0.0435M tris (tris-hydroxymethylaminomethane): 0.177M tris 5.365g を再溜水 200 ml に溶解し、5N HCl 約 5.5 ml にて pH を 7.6 に調整した。これにあらかじめ再溜水 40 ml に溶解しておいた EDTA 4.14g を加え、8N NaOH 約 1ml にて pH を 7.6 に再調整し、再溜水にて全量を 250ml とし、冷蔵庫に保存した。

(B) 酸化型グルタチオン (GSSG): 0.0318 M. GSSG 190 mg を再溜水 10 ml に溶解し、-20°C 保存した。

(C) NADPH (nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced): 0.0087M. NADPH 7.3 mg を再溜水 1.0 ml に溶解した。不安定のため、測定直前に作成し使用した。

(D) FAD (flavin adenine dinucleotide): 1  $\mu$ M. 再溜水にて調整した。

## (4) GR 活性測定系

	FAD ⊖	FAD ⊕
EDTA-tris 緩衝液	2.20 ml	2.20 ml
GSSG 液 (31.8 mM)	500 $\mu$ l	500 $\mu$ l
溶血(粗酵素)液	200 $\mu$ l	200 $\mu$ l
FAD (0.3 mM)	—	10 $\mu$ l

以上を 37°C, 20 分間孵置し, 温度が一定となった後,

NADPH (8.7 mM)	100 $\mu$ l	100 $\mu$ l
----------------	-------------	-------------

を添加し, よく混和後, 340 nm で測定した.

酵素活性は国際単位 IU ( $\mu$ moles NADPH oxidized)/10<sup>10</sup> RBC (minute) をもって表示した. この場合, 赤血球量 (ml RBC) 当りあるいはヘモグロビン濃度 (g Hb) 当りとしてもよい.

## III 成 績

## (1) GR 活性測定上の注意点

GR 活性の測定原理は NADPH $\rightarrow$ NADP の変換量にあるので, 問題は酵素活性測定に用いる分光光度計の使用にあるともいえる.

## (a) 恒温槽の使用

本酵素反応は温度依存性であるので, 一定温度下における測定は絶対不可欠である. 著者らは 37°C を使用したが, これは, 日本の風土上, 室温が夏期にはかなり上昇するので, 20~25°C として条件を設定すると, 夏期には冷却をむしろ必要とすることになり, 温度コントロールが困難となる. この点, 37°C は冬期を主体として, 通常, 加温の形をとることになるので実施が容易であることと, 夏期であっても室温が 37°C を超えることは稀であることから, これも実施上, 有用であることが判った. また, 37°C は体温の正常域として, 測定結果の生理的意義の解釈に当って大切であろう.

次に, 測定時には 37°C に実際の温度が達している必要がある. これに対しては, 分光光度計に設置されている恒温槽の効率にも十分留意し, 多数検体を流れ作業的に処理する場合に

は, この加温作業(室温が 37°C 以下の場合)にかなりの時間を要することになるので, 次の測定セットをキュベット内に予め入れておき, 予加温(ヒーター・ブロックが市販されている)しておく, 能率がよいことが判った. 加温には, キュベットが恒温装置に密着している方が効率がよく, また, 試薬分注時に通常, 冷蔵庫(4°C)保存してある試薬を予め, 室温に戻しておくことも, この恒温(37°C)に達する時間を短縮出来ることになる.

## (b) キュベット内の反応試薬の混和

この混和は使用上, 大切な点である. 反応開始後, 酵素反応による recorder の針が異常に不安定であったり, 反応速度にムラが生じたりする場合は, この混和が不十分であることが多いので, キュベット内に各反応試薬を分注後, パラフィルムなどによって, よくキュベットを覆った後, 反覆反転することによって混和した. この場合, 被覆不十分で, キュベット外に反応試薬が洩れて, キュベット壁をぬらすことがあると, 分光光度計内で光路に障害が生ずることになり, この場合も, recorder の指針が大きくばらつく原因になる. その場合には, キュベット壁をよくふくことによって解決できることが判った.

## (c) 分光光度計使用上の注意点

酵素反応は 340 nm で測定するが, 必ず, 非特異的反応をチェックする目的で試薬 blank をおくことが大切であり, 反応終了後, blank の値で補正する必要がある. 特に NADPH は NADP と比較すると, 非特異的酸化を受けやすいので注意が必要である.

使用する分光光度計に設置されている recorder によっても異なるが, recorder の作動域を十分に活用することが大切である. この点, 作動域を倍数で低減あるいは増幅出来ることが望ましく, この場合, 酵素反応の基準点及びその終了点(実際には O. D. であるが)を自由に換えられる self-compensator の附設されている recorder は, これも使用に際して便利なが多かった. 本研究では, Gilford Automatic

Spectrophotometer Model 2000 を使用した。

また、酵素反応の開始は、キュベット内の試薬温度の恒温性 (37°C) を保つためにも、最小量の試薬添加でスタートすることが望ましい。さらに NADPH は比較的不安定であるので、他の試薬との混注を防ぐことも望ましい。これらの諸理由で著者は、NADPH 添加によって、反応を開始する方法をとった。GR 酵素蛋白の本反応に関する conformation の点からみれば、他の添加順序をとることも、それなりの理由があり、よいと考えられた。

反応終了後、recorder に記録された反応結果を読みとることになるが、この場合、実際の recorder トレースを見ると判然とするが、最初の数分間の部分は捨てることが望ましいことが判った。キュベットを分光光度計に再挿入する際の温度低下、反応開始までの試薬相互間の混和・反応、その他の機械的タイム・ラグを含むためである。その上で、直線性のよい次の 6~12分間のトレース部を用いて酵素反応の変化量を算定した。

また、4 キュベットで同時測定出来る場合には、各測定時ごとに、正常対照を1キュベット入れておくこともよいと考えられる。

### (2) ヒト赤血球 GR 活性の正常値

Long and Carson 法を用いて測定したヒト赤血球 GR 活性は次の様であった。なお、Beutler 法についてもその正常値を掲げた。

Long and Carson 法		
正常成人	FAD ⊖	3.10 ± 0.38 IU/10 <sup>10</sup> RBC
(n=57)	FAD ⊕	4.40 ± 0.39
	非活性型	1.30 ± 0.38
	活性型比率	69.4 ± 3.2%
新生児	FAD ⊖	5.46 ± 0.51 IU/10 <sup>10</sup> RBC
(n=18)	FAD ⊕	7.07 ± 0.46
	非活性型	1.61 ± 0.26
	活性型比率	77.2 ± 4.8%
Beutler 法		
正常成人	FAD ⊖	7.18 ± 1.09 IU/g Hb
	FAD ⊕	10.40 ± 1.50 "
	非活性型	3.22 ± 0.41 "
	活性型比率	69.0 ± 8.9%

\* 文献 15) による。

### (3) GR 活性その性状の検索

赤血球 GR 活性値を測定する以外に、GR 酵素の異常は、その基質 (GSSG) あるいは補酵素 (NADPH) に対する Michaelis 定数 (Km) を測定することによっても知ることができる。また、赤血球 GR は FAD によって、その apoenzyme が活性化されることが知られている。<sup>8)12)</sup> そこで FAD による賦活化効果、およびその検索に必要な apoenzyme の粗精製についても検討した。なお、本酵素の性状は酵素蛋白に対する免疫化学的な方法によっても検索出来るが、本項では省略した。

(a) 酸化型グルタチオン (GSSG) に対する GR のミカエリス定数 (Km GR for GSSG) の測定

(i) 溶血液 (粗 GR 酵素液) の調製

洗滌赤血球 (Hct 30%) 200 μl

再溜水 1.80 ml

この 1:10 稀釈 (溶血液) 200 μl を各々使用した。

(ii) 測定系 (Table 1)

上記の測定系 2.70 ml

1:10 溶血液 (1) 0.20 ml

37°C, 20分間孵置し、キュベット内温度が一定に達した時点で、NADPH (8.7 mM) 100 μl を添加し、反応を開始した。以下に 2 例を代表例としてあげ、測定値の計測および Km GR

Table 1 Assay System of Km Red Cell Glutathione Reductase for Oxidized Glutathine (GSSG)

測定番号	EDTA-tris 緩衝液	再溜水	GSSG 液		終濃度 (GSSG) (μM)
			31.8 mM 液	3.18 mM 液	
1	2.20 ml	0	500 μl		5300
2	2.20	450 μl	50		530
3	2.20	480	20		212
4	2.20	490	10		106
5	2.20	495	5		53
6	2.20	480		20 μl	21
7	2.20	490		15	11
8	2.20	495		5	5

**Table 2** Michaelis Constant  
(Km GR for GSSG)

(i) Case 1

測定 番号	GSSG 終濃度	実測値 ( $\Delta$ OD/8分)	GR活性 (IU/10 <sup>10</sup> RBC)
1	5300 $\mu$ M	0.273	2.76
2	530	0.267	2.70
3	212	0.231	2.33
4	106	0.174	1.76
5	53	0.134	1.35
6	21	0.090	0.91
7	11	0.072	0.73
8	5	0.055	0.56

(ii) Case 2

測定 番号	GSSG 終濃度	実測値 ( $\Delta$ OD/8分)	GR活性 (IU/10 <sup>10</sup> RBC)
1	5300 $\mu$ M	0.424	4.94
2	530	0.400	4.66
3	212	0.336	3.91
4	106	0.244	2.84
5	53	0.166	1.93
6	21	0.101	1.18
7	11	0.080	0.93
8	5	0.068	0.79

for GSSG を掲げた (Table 2).

正常 26 例について検討したところ, Km GR for GSSG は  $111 \pm 15 \mu$ M であった.

(b) 補酵素 NADPH に対する GR の Michaelis 定数 (Km GR for NADPH) の測定

前項 Km GR for GSSG にならって, 測定系を設定した (Table 3).

**Table 3** Assay System of Km Red Cell GR  
for NADPH

測定 番号	EDTA- tris 緩衝液	再溜水	GSSG	NADPH 液		終濃度 (NADPH) ( $\mu$ M)
				8.7 mM 液	0.87 mM 液	
1	2.20 ml	0 $\mu$ l	500 $\mu$ l	100 $\mu$ l		290
2	2.20	50	500	50		145
3	2.20	80	500	20		44
4	2.20	0	500		100 $\mu$ l	29
5	2.20	20	500		80	23
6	2.20	40	500		60	17
7	2.20	50	500		50	15
8	2.20	60	500		40	11
9	2.20	70	500		30	9

以上のうち NADPH 液を除いて, これに 1:10 溶血液 0.20 ml を加えて 37°C, 20 分間孵置し, 温度が一定となった後, 上記の NADPH 液を各々添加して, 反応を開始した. 実例は省略するが, Km GR for GSSG の場合に準じて各条件における活性値から, 図により Km GR for NADPH を得た.

正常成人 (26 例) 赤血球について検討したところ, Km GR for NADPH は,  $19.8 \pm 2.7 \mu$ M であった.

(c) FAD による赤血球 GR 活性の賦活化  
赤血球 GR 活性測定に使用する粗酵素標品としての溶血液に諸濃度の FAD を添加し, 予孵置することによって, GR 活性の賦活化を検討した (Table 4). 賦活化に要する FAD 濃度は

**Table 4** Activation of Red Cell GR  
by FAD (n=38)

FAD 終濃度	赤血球 GR 活性
0 $\mu$ M	$2.85 \pm 0.32$ IU
0.2	$3.62 \pm 0.45$
0.5	$3.90 \pm 0.47$
1.0	$4.32 \pm 0.56$
5.0	$4.28 \pm 0.62$
10.0	$4.30 \pm 0.54$

1.0  $\mu$ M 前後であり, それ以上の高濃度では (10  $\mu$ M まで) 一定値に達して増加効果は得られなかった. 従って活性型 GR (FAD $\ominus$ ) に, FAD 添加によって得られる増加分, 即ち非活性型 GR (FAD $\oplus$ -FAD $\ominus$ ) との活性測定に当っては, 通常の場合では, FAD 1  $\mu$ M で十分と考えられた. ただ, 赤血球 GR 活性 (FAD $\ominus$ ) が著しく低値を示すような症例では, 全 GR 活性 (FAD $\oplus$ ) が正常値を示すと仮定すると, FAD 添加によって得られる増加分 (非活性型 GR) が大きくなるので, こうした症例では, FAD 濃度を多少高めに設定するか, あるいは FAD 濃度を 1  $\mu$ M で一定とした場合には, 通常の前孵置時間 (10~30 分) を多少長めに取るとよいと考えられる.

ちなみに Km GR for FAD は  $0.24 \pm 0.07 \mu\text{M}$  であった。また、この FAD の GR に対する結合は強く、 $4^\circ\text{C}$  又は  $37^\circ\text{C}$  において 14 時間保存しても全く活性値に変化は認められなかった。

(d) 赤血球 GR 活性の pH 依存性

正常成人赤血球 GR 活性の pH 依存性を検討した。成績は **Table 5** の通りであった。即ち、緩衝液 pH を 6.0~7.8 の領域でかえて、赤血球 GR を測定し、その最大活性値を 100 とし、各 pH における GR 活性値を % で表示した。pH 6.2~7.6 の領域でほぼ平坦な最大活性が得られており、pH 6.0 あるいは pH 7.8 の両端においても、少なくとも約 80% の活性値が得られた。

(e) 赤血球 GR の apoenzyme の粗精製と FAD による活性化

赤血球 GR の性状を検討するために、溶血液を用いて、FAD を外すことによって apoenzyme の粗標品を作成した。<sup>6)</sup>

方法: 1:10 溶血液 5.0 ml に飽和硫酸 6 ml を加え、0.1N HCl にて pH 3.0 とし、 $4^\circ\text{C}$  にて 1~2 時間保存の後、遠沈 (3000 g, 30 分,  $4^\circ\text{C}$ ) によって上清を捨て、沈渣に 1M tris HCl 緩衝液 (pH 8.0) 0.3 ml と再溜水 1.0 ml を加え、再度溶解した。本操作を反覆することによって、GR 活性値を全く欠いているか、あるいは殆んど活性の認められない GR 粗標品が得られた。これに FAD ( $1\sim 10 \mu\text{M}$ ) を添加することによって、原標品に存在していた GR 活性の  $96.3 \pm 3.7\%$  を回復させた。

(4) 赤血球 GR 活性と網赤血球数

赤血球 GR 活性に対する幼若赤血球の関与について、網赤血球数を指標として検討した (**Fig. 1**)。網赤血球増加症は諸種疾患赤血球を使用した。全般的には、やや GR 活性は亢進を示すものの、網赤血球増加症の程度とは相関が認められなかった。従って、幼若赤血球あるいは白血球の関与について、GR 活性は、

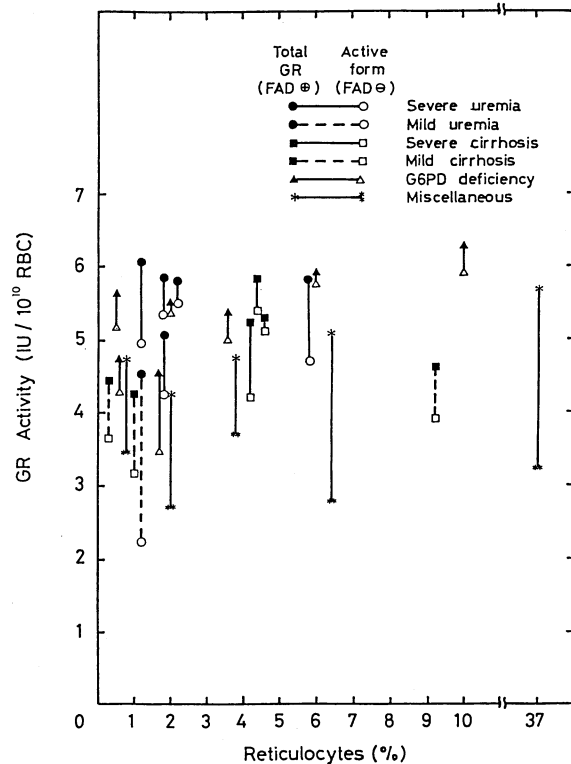
**Table 5** pH Dependency of Red Cell GR

水素イオン濃度 (pH)	赤血球 GR 活性値 (最大活性に対する%)
6.00	84.8 ± 3.9
6.20	89.7 ± 3.5
6.40	92.4 ± 2.2
6.60	94.5 ± 1.6
6.80	96.6 ± 2.1
7.00	94.3 ± 2.3
7.20	92.0 ± 2.4
7.40	88.2 ± 2.7
7.60	87.4 ± 3.2
7.80	76.7 ± 3.1

これら細胞の存在によって、ピルビン酸キナーゼや、G-6-PD の場合のような、著しい活性上昇をみることは比較的少なかった。

また、幼若赤血球の関与については、急性溶血症例あるいは急性出血症例では、網赤血球数

**Fig. 1** Relationship between red cell glutathione reductase activity (FAD ⊖/FAD ⊕) and reticulocytosis



を指標とする場合には、その幼若度について直線性が得にくいので、むしろ G-6-PD 活性をその指標とする方が望ましいかも知れない。

#### IV 考 按

赤血球 GR は赤血球諸酵素のうち、基本的測定原理を把握しさえすれば比較的測定の容易な酵素と考えられる。その測定に関連する諸注意点を検討した。本酵素は赤血球グルタチオン代謝の上で、key enzyme の一つであり、しかも、flavin 依存性酵素であることから、flavin 代謝異常症の発見にも極めて有用と考えられ

る。この flavin のうち、本酵素の補酵素は FAD であるが、血漿中の riboflavin から赤血球内で FAD となる点から考えて、本酵素の活性値は、holloenzyme に異常がないと仮定すれば、血漿中の riboflavin 代謝に深く関連していると考えられ、riboflavin 欠乏症の発見にはよい指標となると推定され、今後、詳細に検討の予定である。

#### 謝 辞

本研究の一部は東京田辺製薬KKの援助によったことを記し、ここに深謝する。

#### 文 献

- 1) 三輪史朗：遺伝性溶血性貧血。日内会誌 73 : 1269—1284, 1984
- 2) Beutler, E.: Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism. New York, Plenum Press. 1978, pp. 1—226
- 3) Proceedings of a U. S. -Japan Cooperative Science Program: Red cell enzymes and abnormalities. Hemoglobin 4 : 575—844, 1980 Huisman et al. (ed.)
- 4) Weatherall, D. J.: Advances in red blood cell biology. New York, Raven. 1982
- 5) Colowick, S., Lazarow, A., Racker, E., Schwarz, D. R., Stadman, E., and Waelsch, H. (ed.): Glutathione. A symposium. New York, Academic Press. 1954, pp. 1—341
- 6) Prins, H. K. and Loos, J. A.: Glutathione. In Biochemical methods in red cell genetics, ed. by Yunis, J. J. New York, Academic Press. 1969, pp. 115—137
- 7) Brewer, G. J.: 6-Phosphogluconate dehydrogenase and glutathione reductase. In *ibid.* 1969, pp. 139—165
- 8) Beutler, E.: Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: In vivo and in vitro studies. J. Clin. Invest. 48 : 1957—1966, 1969
- 9) Bamji, M. S.: Glutathione reductase activity in red blood cells and riboflavin nutritional status in humans. Clin. Chim. Acta 26 : 263—269, 1969
- 10) Yawata, Y. and Tanaka, K. R.: Studies on glutathione reductase and regeneration of reduced glutathione in normal human adult and cord red cells. Clin. Chim. Acta 46 : 267—275, 1973
- 11) Yawata, Y. and Tanaka, K. R.: Red cell glutathione reductase: Mechanism of action of inhibitors. Biochim. Biophys. Acta 321 : 72—83, 1973
- 12) Yawata, Y. and Tanaka, K. R.: Regulatory mechanism of glutathione reductase activity in human red cells. Blood 43 : 99—109, 1974
- 13) Cutts, J. H.: Cell separation. Methods in hematology. New York, Academic Press. 1970
- 14) Long, W. K. and Carson, P. E.: Increased erythrocyte glutathione reductase activity in diabetes mellitus. Biochem. Biophys. Res. Commun. 5 : 394—399, 1961
- 15) Beutler, E.: Red cell metabolism. A manual of biochemical methods. 2nd ed. New York, Grune and Stratton. 1975, pp. 69—71
- 16) Icén, A.: Glutathione reductase of human erythrocytes. Purification and properties. Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl. 96 : 1—67, 1967