

# 血球素及びその誘導体の「カタラーゼ能並びに血球素の不能働化に対する「カタラーゼ」の影響

金沢大学医学部生理学教室(主任 斎藤教授)

關 口 晃

Akira Sekiguchi

(昭和28年9月28日受附)

血球素の機能, 血球素に対する「カタラーゼ」の影響その他多くの研究に「カタラーゼ」を含まない, 酸素結合能低下のない純粋な血球素標品が必要である。従来多くの血球素精製法が報告されているが, 血球素と「カタラーゼ」を完全に分離することは困難とされていた。従つがつて「ヘム化合物には「カタラーゼ作用があるが, 「カタラーゼ」を含まない血球素, 「メトヘモグロビン」の「カタラーゼ能の信頼すべき値は報告されていない。Wu, H.,<sup>1)</sup> Kühn, R.,<sup>2)</sup> Haurowitz, F.<sup>3)</sup>等は血球素の「カタラーゼ能を報告しているが, 研究者によつて異なつた精製法を用い, 「カタラーゼ能の測定方法も異なつているのでこれらの結果を比較し, 何れが最も優れた精製方法か判定することが出来な

い。又酸素結合能も測定してないので得られた血球素の活性度を知ることも出来ない。

著者は従来報告されている数種の方法について血球素を精製し, 「カタラーゼ能及び酸素結合能を比較し最も優れた方法を選定し, これに若干の改良を加えた。かくして得た純粋な血球素について「カタラーゼ能, 酸素結合能, 「スペクトルグラム」を測定した。又「カタラーゼ」を含まない「メトヘモグロビン」, 「ヘミン」, 「ヘマチン」を精製しその「カタラーゼ能を測定した。

次いで血球素の不能働化に対する「カタラーゼ」の影響を検討した。これは「カタラーゼ」を含まない血球素を精製することが出来て初めて可能な実験である。

## I. 血球素の精製

多くの血球素精製法の原理は, 血球素の溶解度を小さくして結晶として析出せしめることにあるが, 次の五つの代表的な方法について実験を行った。

- A. 電気透析 (Stadie & Ross)<sup>4)</sup>
- B. 吸着剤による「カタラーゼ」の吸着 (Wu, H.)<sup>1)</sup>
- C. 炭酸ガス, 酸素の混合気体の通気 (Heidelberger, M.)<sup>5)</sup>
- D. 塩析 (Dittlich, P.)<sup>6)</sup>
- E. 等電点による結晶化 (Keilin & Hartree)<sup>7)</sup>

### カタラーゼ能の測定方法:

血球素溶液 1cc を  $\frac{N}{25}$   $H_2O_2$  溶液 (溶媒は pH 6.8 の  $\frac{M}{15}$  磷酸緩衝液) 5cc に 25°C の恒温槽中で作用せしめ, 一定時間の後 10%  $H_2SO_4$  2cc を加え反応を停止させる。然る後残存せる  $H_2O_2$  量を「ヨード法によつて定めると「カタラーゼ能は次式で示される<sup>8)</sup>。

$$[\text{カタラーゼ能 (C} \cdot \text{A} \cdot \text{)}] = \frac{1}{t} \log \frac{a}{b}$$

ここで t は作用時間 (分), a は反応開始前の  $H_2O_2$  量 (cc) 及び b は残存せる  $H_2O_2$  量 (cc) である。なお血球素溶液の濃厚なとき又は「カタラーゼ能が大きいときは, 適当に希釈して測定し, 原液の「カタラーゼ能を算出した。

**血球素量の測定方法：**

血球素溶液を試薬（赤血塩 0.7, 青化曹達 0.3 水 1000）<sup>10)</sup> に 500 倍に稀釈し「青化ヘモグロビン」となし光電比色計（日立, 「フィルター」BG）によつて測定した。吸光係数は標準血液の血球素量を Van Slyke 検圧法で測定して求めた。

血球素量を鉄に換算し、鉄 1millimol 当りの「カタラーゼ能 (Fe Cat. A. =  $\frac{C \cdot A \cdot}{\text{millimol Fe}}$ )」を計算すると、Fe Cat. A. は血球素から「カタラーゼ」が除かれれば除かれる程小さくなる。即ち Fe Cat. A. は血球素から「カタラーゼ」が除かれた程度を示す指標となる。

又血球素の酸素結合能を測定して、同時に行う比色による測定値より理論的に得られる酸素結合能を 100 とし百分率をとり血球素の活性度とした。

対照として新鮮な馬血液の Fe Cat. A. 及び活性度を求めると第 1 表の如き成績を得た。

第 1 表

No.	Fe Cat. A.	活性度 (%)
1	12,290	93.5
2	13,390	100.3
3	10,250	100.0
4	10,180	100.2
5	14,180	100.1
6	10,680	105.0
7	12,390	101.0
8	11,010	108.7
平均	11,850	101.1

**A. 電気透析 (Stadie & Ross)<sup>11)</sup>**

新鮮な馬血液にて赤血球を血清より分離し 0.9% 食塩水で 2 回以上洗滌する。赤血球 200cc を 3~5 時間電気透析すると多量の血球素結晶が析出して来る。これを遠心分離し冷水で洗滌する。電気透析及び洗滌によつて「カタラーゼ」は除かれ Fe Cat. A. は約 830 に下り、血液の  $\frac{1}{10}$  以下となる。しかし 2 回以上洗滌しても Fe Cat. A. はこれ以上小さくならない。

2 回洗滌した結晶を等量の水に混じ、1N 炭酸ソーダを加えて溶解しこれを 10 時間以上電気透析すると、更に「カタラーゼ」は除かれ

Fe Cat. A. は約 430 まで低下するが、血球素の結晶を得ることは出来なかつた。

**B. 吸着剤による「カタラーゼ」の吸着 (Wu, H.)<sup>11)</sup>**

「磷酸カルシウム」, 「水酸化アルミニウム」は一定の条件の下で「カタラーゼ」を吸着するので Wu, H., Hogness, T. R.<sup>11)</sup> 等により血球素の精製に利用されている。

洗滌した馬赤血球に 2 倍量の水を加え溶血せしめ、これに吸着剤（「磷酸カルシウム」, 「水酸化アルミニウム  $\alpha$ 」, 「水酸化アルミニウム  $\beta$ 」）を加え醋酸で pH を 4.8 に調整する。混合液を約 10 分攪拌して「カタラーゼ」を吸着せしめ遠心分離する。上澄に対し同様の吸着操作を 2 回繰返し、最後にはすべての試料に対し「磷酸カルシウム」で処置した。以上 4 回の処置の都度上澄の Fe Cat. A. を測定した成績の平均は第 2 表の如くなる。

第 2 表

	Fe Cat. A.		
	Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	Al(OH) <sub>3</sub> $\alpha$	Al(OH) <sub>3</sub> $\beta$
吸着 1	882	921	957
" 2	870	998	997
" 3	770	675	803
Ca <sub>3</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>	757	710	761

これより何れの吸着剤でも Fe Cat. A. は略々同じ値であり、吸着剤を互いに換えても Fe Cat. A. は低下しないことが分る。Wu, H. によれば「アルミナクリーム」で「カタラーゼ」を吸着し、最初の処置から 3 回目まで「カタラーゼ」能が血球素量に比例しているのだから「カタラーゼ」は第 1 回の吸着により完全に除かれ、血球素本来の「カタラーゼ」能を得ると結論している<sup>11)</sup>。事実第 2 表に見る如く吸着を繰返しても Fe Cat. A. は吸着 1 の値と略々同じである。しかし Fe Cat. A. 700~800 という値は可成り大きい値であり、吸着剤の性能ではこれ以上「カタラーゼ」を除くことが出来ないもの

と考えられる。

C. 炭酸ガス、酸素の混合気体の通気  
(Heidelberger, M.)

2回電気透析した濃厚な血球素溶液を 0°C で $\frac{1}{2}$ 容量の氷冷した「アルコール」を攪拌しつつ極めて徐々に加える。これを冷水中に入れ 4:1 の割合の炭酸ガス、酸素の混合気体を通ずると多量の血球素結晶が析出する。混合液が糊状になるまで数分間通気を続け、遠心分離して結晶を得る。結晶を冷水で2回洗滌し(2回以上洗滌しても「カタラーゼ」は除去されない)、結晶を等量の水に溶解し、この血球素溶液に同じ操作を施し結晶化を5回繰返した。操作の都度 Fe Cat. A. を測定し4例の平均を第3表に示した。これより明らかな如く Fe Cat. A. は結晶化の2回目までは低下するが、更に繰返しても Fe Cat. A. は変わらない。

第 3 表

混合気体通気法		塩 析 法	
	Fe Cat. A.		Fe Cat. A.
結晶化 1	200.2	塩 析 1	39.4
〃 2	50.0	〃 2	26.4
〃 3	59.4	電気透析	13.7
〃 4	53.1	塩 析 3	10.5
〃 5	56.0	〃 4	11.5
		〃 5	10.4
		電気透析	11.6

D. 塩析 (Dittlich, P.)<sup>4)</sup>

硫酸安門による塩析では特に馬の血液から多量の結晶を容易に得られるが、「メトヘモグロビン」の混入する欠点がある。2回電気透析した血球素溶液に 1N 炭酸ソーダを加えて pH を 7.8 とし、1ℓ に対し 50~79cc の「エーテル」を 0°C で加え、これを氷冷した飽和硫酸安門 700cc 加える。充分混和振盪し 5~10分後遠心分離し「エーテル層を除き、醋酸で pH を 6.8 に調整し室温で時々攪拌して一晩放置すると多量の結晶を生ずる。これを冷水で2回洗滌し等量の水に溶解し塩析を2回繰返す。2回

目の再結晶後は結晶が compact でないので洗滌せずに塩析を続けた。その後硫酸安門及び「カタラーゼ」を除くため 20 時間電気透析し、更に塩析を繰返し最後に再び電気透析を行った。各操作の都度 Fe Cat. A. を測定し5例の平均を第3表に示した。これより明らかな如く塩析を3回以上行つても Fe Cat. A. の値は小さくならず、血球素一定量当りの「カタラーゼ」能は再結晶によつて低下しない。この Fe Cat. A. は A. B. C の値に比し遙かに小さいが、かくして得られた血球素の活性度は約 60% であり、相当不能働化している。

E. 等電点による結晶化 (Keilin & Hartree)<sup>5)</sup>

先ず「アルコール」で血球素結晶を析出せしめ洗滌した後等電点による結晶化を実施した。最初の結晶化は他の方法でも良いが、「アルコール」を用うるのが操作が簡便なので好都合である。

よく洗滌した馬赤血球 300cc を 0°C において氷冷した水 90cc 及び予め 1N 苛性ソーダで洗い氷冷した「エーテル」90cc を加え、5分間振盪した後遠心分離して「エーテル層を除き濾過する。0°C において濾液に氷冷した「アルコール」を極めて徐々に攪拌しつつ最終濃度が 20% になるまで加える。これを氷室中に一晩放置すると血球素の結晶を析出する。結晶を氷冷した 20% アルコール及び水で洗滌し、略々等量の水に混合し 40°C まで温める。これに  $\frac{M}{5}$  第 2 磷酸ソーダ又は 1N 炭酸ソーダを加えて溶解した後、 $\frac{M}{5}$  第 1 磷酸カリ又は醋酸を滴々加えて血球素の等電点である pH 6.8 に調

第 4 表 再結晶と Fe Cat. A. の減少

No.	1	2	3	4	5	平均
アルコール法	125.0	143.0	141.0	110.0	137.0	131.1
等電点 1	39.1	35.8	36.2	36.2	31.8	36.2
〃 2	12.3	12.8	8.73	11.7	9.64	11.0
〃 3	12.5	13.0	11.8	10.0	10.6	11.6
〃 4	11.7	11.6	10.2	12.5	11.3	11.5

整する。この場合生ずる微細な濁濁は遠心分離して除き、一晚氷室中に放置すると血球素は再び析出して来る。この結晶を等量の水に溶解し同様に等電点を利用して再結晶を4回繰返した。再結晶の都度測定した Fe Cat. A. は第4

表に示した如く、等電点による再結晶を2回実施した後は低下せず、而もその値は塩析の場合と等しい。このようにして得た血球素の活性度は約95%であり酸素結合能の低下が少ない。

## II. 血球素及び「メトヘモグロビン」の「カタラーゼ能及び「スペクトルグラム」

以上の実験成績を検討するに A, B, C の方法によるときは、「カタラーゼ」をある限界までは能率よく除くことが出来るが、それ以上除くことは出来ない。Hauowitz, F. は C の方法によつて精製し血球素の「カタラーゼ能を測定しているが<sup>9)</sup>、以上の結果から見ると未だ完全に「カタラーゼ」の除かれた血球素の「カタラーゼ能とはいえない。塩析又は等電点によるときは Fe Cat. A. が非常に小さく、而も両者の値が一致しているから完全に「カタラーゼ」が除かれたと見做してよい。しかし塩析によつて得た血球素の酸素結合能は相当低下しているが、等電点を利用するときは酸素結合能の低下

が少なく、これが最も有利な精製方法である。

等電点を利用して2回再結晶して得た血球素結晶を略々等量の水に溶かし3時間電気透析、遠心分離して不純物を除き純粋な血球素溶液(13~18gr/dl)を得た。この「カタラーゼ能(FeCat. A.)及び活性度は第5表に示した。即純粋な血球素の「カタラーゼ能はこれと同量の血球素を含む血液の「カタラーゼ能の約0.1%であり、活性度は95%である。

又この血球素の「スペクトルグラム」(「ベックマン分光光度計)は第1図に示した如く、吸収帯の位置、分子吸光度共に典型的な「オキシヘモグロビン」の像を呈する<sup>10)</sup>。

第 5 表

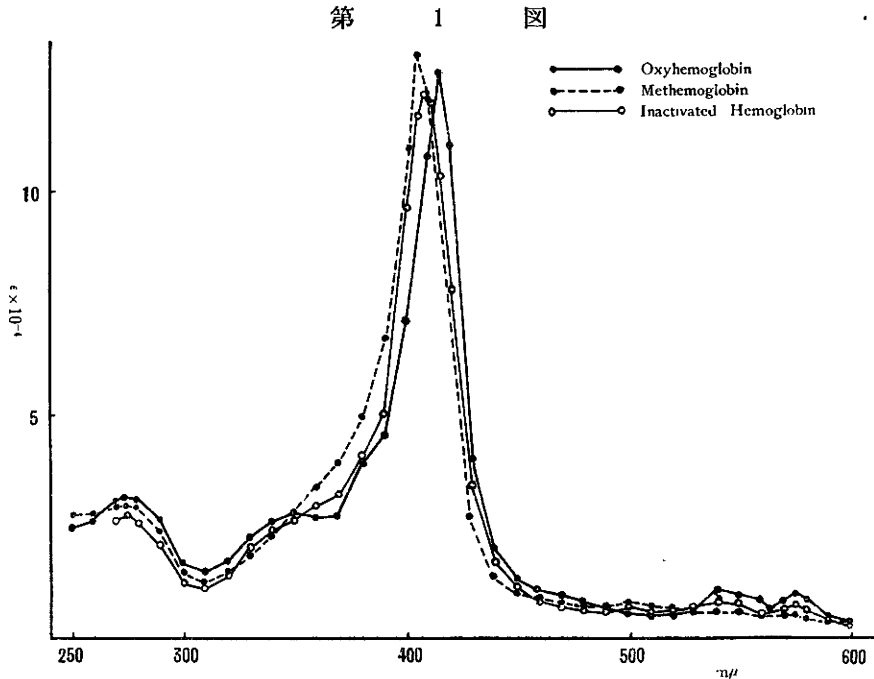
No.	Oxy Hb		Met Hb	ヘミン	ヘマチン
	Fe Cat. A.	活性度(%)	Fe Cat. A.	Fe Cat. A.	Fe Cat. A.
1	13.5		13.7	59.0	
2	15.3	93.3	13.5	65.5	
3	14.3	94.5	8.8	40.0	
4	10.6	92.2	13.0	38.5	
5	9.6	96.4	14.0	47.1	54.0
6	11.7	96.4		47.5	57.0
7	9.6	98.0		59.1	59.5
8	12.9	92.3		51.1	46.8
9				50.6	49.1
10				53.0	51.1
平均	12.2	94.7	12.6	51.1	52.9

「カタラーゼ」を含まない「メトヘモグロビン」を得るため、上述の血球素溶液に10%赤血塩少量を加え数時間放置して「メトヘモグロビン」に

変化させる。これを2~3時間電気透析し、遠心分離して不純物を除き「メトヘモグロビン」を得た。この「カタラーゼ能及び「スペクトル

グラム」(pH. 5.6 にて測定) は第5表及び第1図に示した。これより「メトヘモグロビン」の「カタラーゼ能は血球素のそれと略々同じで

あることが分る。又「スペクトルグラム」は従來の記載と一致した結果を得た<sup>13)</sup>。



### III. 「ヘミン」, 「ヘマチン」の「カタラーゼ能

「ヘミンの精製は Schaftejew<sup>13)</sup>の方法に従い、予め 2gr の食塩を加えた氷醋酸 500cc を沸騰せしめ、これに血液 180cc を攪拌しつつ注加し 10分間沸騰を続け、暫時の後 1500cc の水を加えると「ヘミン」の結晶が生ずる。一晩放置後遠心分離し醋酸、「アルコール」, 「エーテル」で洗滌し乾燥する。

「ヘマチン」の精製は「ヘミン」を 10%苛性ソーダに溶かし稀塩酸を注意深く注加すると、「ヘミン」は不定形の沈澱として得られる。これを遠心分離し「ヘミン」同様洗滌し乾燥する。

「ヘミン」, 「ヘマチン」は精製中に沸騰せしめるので、「カタラーゼ」は完全に破壊され、その残存は考慮する必要がない。

これらの標品の一定量を水に 1N 炭酸ソーダを加えつつ溶かし、「カタラーゼ能及び鉄 (Wong 法) を測定し Fe Cat. A. を求めた。結果は第5表に示した。即ち「ヘミン」, 「ヘマチン」の「カタラーゼ能は略々同じであり、共に血球素の「カタラーゼ能より大きく<sup>3)</sup>約5倍である。

### IV. 血球素の不能働化に対する「カタラーゼ」の影響

血液カタラーゼ」の生理学的機能はなお充分明らかでなく、代謝の結果產生された  $H_2O_2$

を水と酸素に分解し血球素を  $H_2O_2$  による酸化より保護し<sup>14)</sup>、發生した酸素は血球素の

oxygenation に利用するものと推測されている。又血球素と  $O_2$  との過酸化水素様結合を「カタラーゼ」が解離され易くする、従つて生体内における酸素の解離を容易にするともいわれている<sup>15) 16)</sup>。或いは「ペルオキシダーゼ様作用がむしろ「カタラーゼ」の第一義的な機能であるともいわれている<sup>17)</sup>。

血球素を  $37^{\circ}C$  中に保存すると徐々に酸素結合能を失い所謂不能働化する。不能働化の機作は不明であるが、この場合「カタラーゼ」の存在が不能働化を阻止するか否か、若し阻止すれば「カタラーゼ」は血球素を不能働化より保護する作用を持つと考えることが出来る。これを確かめるために前述の「カタラーゼ」を含まない血球素と馬血液から精製した「カタラーゼ」<sup>18)</sup>とを試料として実験を行つた。

血球素溶液は保存中腐敗の恐れがある。これを防ぐには防腐剤を加えなければならない。防腐剤を選定するため次の如き実験を行つた。即ち牛の溶血血液を四つに分ち対照の他に (1) Chloroform を  $5cc/l$ , (2) Toluol を  $5\%$ , (3) 結晶ペニシリン G (明治) を  $40000Units/dl$  の割に加え  $35^{\circ}C$  中に保存した。腐敗すれば酸素

結合能を失うはずであるから、夫々の酸素結合能を時間の経過と共に測定した。結果は第 2 図の如くなり (3) が最も酸素結合能の低下が少なく、「ペニシリン」が強い防腐作用を持つと考えられる。(1), (2) が対照より酸素結合能の低下が甚だしいのは Chloroform, Toluol が血球素に対し変化を与えるためであろう。この結果から「ペニシリン」を加えれば腐敗が完全に阻止出来るとはいえないが、これを以て一応腐敗は防ぎ得るものとして実験を進めた。なお血球素に「ペニシリン」を加えることによつて、酸素結合能、「スペクトルグラム」には変化のないことを確めた。

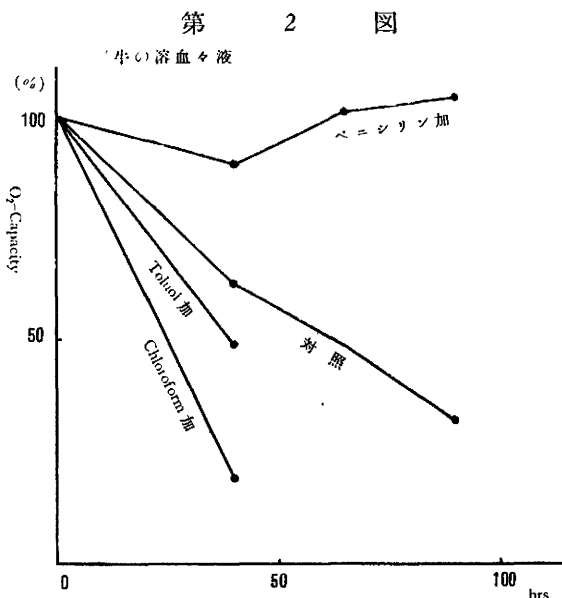
#### A. 実験方法

活性度  $93\sim98\%$  の血球素溶液 ( $13\sim18gr/dl$ ) に予め  $40000 Units/dl$  の割に「ペニシリン」を加え三つに分ち、(1) には精製カタラーゼを Fe Cat. A. が血液と略々同じになるように加え、(2) には精製カタラーゼの溶媒である第 2 磷酸ソーダを (1) と同量加え、(3) には「ゲラチン」(一晝夜透析し、カタラーゼ能なきを確かめた) を加える。これを  $35^{\circ}C$  中に保存し時間の経過と共に酸素結合能を測定し、血球素の不能働化に対する「カタラーゼ」の影響を検討した。

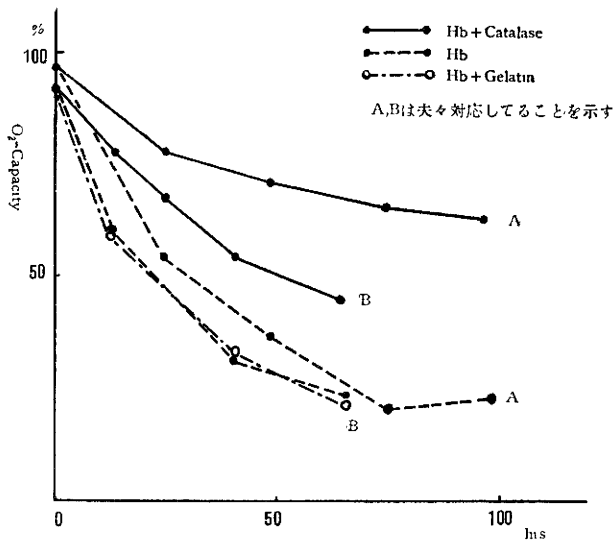
#### B. 実験結果

結果の 1 例は第 3 図の如くなり「カタラーゼ」を入れた血球素の活性度は比較的高く保つが、入れないもの著しく低下する。不能働化の速度は試料により差があり定量的に定めることは出来ないが、定性的には常に「カタラーゼ」を入れた場合の不能働化は、入れない場合より少ない。即ち「カタラーゼ」を含まない血球素は速かに不能働化するが、「カタラーゼ」が共存するときは不能働化が少なく、「カタラーゼ」は血球素の不能働化を防ぐ作用があることが推測される。

この場合「カタラーゼ」の膠質としての作用によつて不能働化が阻止される可能性も考えられる。しかし「カタラーゼ」の代わりに「ゲラチン」を加えた場合 (3) は全



第 3 図



然保護作用なく対照と全く一致した結果を得た。故に「カタラーゼ」の不能働化に対する保護作用は膠質としての保護作用ではなく、「カタラーゼ」の特有な作用によるものであろう。

不能働化した血球素(活性度約20%)の「スペクトルグラム」は第1図の如くなる。即ち500以上の波長の部分では「オキシヘモグロビン」と同じであるが、それ以下では「メトヘモグロビン」と一致した像を示す。これより一部は「メトヘモグロビン」変化したことが推定されるが、それ以上の結論を導き出すことは出来ない。

## V. 結

「カタラーゼ」を含まない純粋な血球素を得るために従来報告されている数種の血球素精製法を比較検討し、「カタラーゼ」を含まない酸素結合能の低下の少ない方法を選定した。このようにして得た血球素及び「カタラーゼ」を含まない「メトヘモグロビン」、「ヘミン」、「ヘマチン」の「カタラーゼ能」を測定した。なお血球素、「メトヘモグロビン」の確認は分光光度計によつた。又血球素の不能働化に対する「カタラーゼ」の影響を検討し、次の如き結果を得た。

1. 馬血液より「アルコール」によつて血球素結晶を得、それを溶解し等電点による再結晶を2回繰返すことにより「カタラーゼ」を全く含まないと考えられる純粋な血球素を得る。この「カタラーゼ能」は血液の同量の血球素に比較すると「カタラーゼ能」の0.1%、活性度は95%で

## 論

ある。

2. 「メトヘモグロビン」の「カタラーゼ能」は血球素のそれと略々同じである。

3. 「ヘミン」、「ヘマチン」の「カタラーゼ能」は略々同じであるが赤血球の約5倍である。

4. 「カタラーゼ」は血球素の不能働化を保護する作用があり、これは「カタラーゼ」の膠質としての作用ではなく、「カタラーゼ」の特有な作用によるものである。

5. 不能働化した血球素の分光分析の結果は一部が「メトヘモグロビン」に変化していることを認めるのみで、明確な結論は得られなかつた。

終りに当り御指導と御校閲を頂いた齊藤教授に感謝します。

## 文

1) Wu, H. : (1923) Studies on hemoglobin IV, The catalase activity of hemoglobin and its derivatives., J. Biochem., 2, 195. 2)

## 献

Kühn, R. & L. Braun : (1927) Über die katalatische Wirksamkeit verschiedener Blutfarbstoffderivate., Hoppe-Seyler's Z., 168, 27.

- 3) **Haurowitz, F.** : (1931) Die katalatische Wirkung des Blutfarbstoffes., Hoppe-Seyler's Z., **198**, 9.      4) **Stadie, W. & F. C. Ress** : (1926) Studies on the oxygen-, acid- and base-combining properties of blood., J. Biol. Chem., **68**, 229.      5) **Heidelberger, M.** : (1922) A method for the preparation of crystalline oxyhemoglobin., J. Biol. Chem., **53**, 31.
- 6) **Dittlich, P.** (1891) Arch. exp. Path. Pharm., **29**, 31.      7) **Keilin, D. & E. F. Hartree** : (1935) The combination between methemoglobin and peroxides., Proc. Roy. Soc., B **117**, 1.
- 8) 齋藤幸一郎 : (1943) 血液カタラーゼの研究 II. 医学と生物学, **14**, 27.      9) 関口晃 : (1953) 赤血球浮遊液のカタラーゼ能の研究. 日本生理誌, **15**, 357.      10) 嶋谷亮一 : (1949) 血球素の光学的定量法. 日新医学, **36**, 452.
- 11) **Sidwell, A. E., Much, R. E., Guzman, E. S. and T. R. Hogness** : (1938) The salt effect on the hemoglobin-oxygen equilibrium., J. Biol. Chem., **123**, 335.      12) **Keilin, D.** : (1933) On the combination of methemoglobin with H<sub>2</sub> S., Proc. Roy. Soc., B **113**, 393.
- 13) **Plimmer, R.** : (1927) Practical organic and bio-chemistry, 494.      14) **Bingold, K.** : (1935) Neue Wage zur Auffindung des physiologischen Blutfarbstoffabbaues., Naturw., **26**, 656.
- 15) **Ewald, W.** : (1907) Die Physiologie der oxydativen Blutferment., Pflüger's Arch. **116**, 334.      16) 石川哲郎 : (1935) 血液カタラーゼの作用に関する一新事実. 東北医誌, **18**, 297.
- 17) **Keilin, D. & E. F. Hartree** : (1945) Biochem. J., **29**, 289.      18) 齋藤幸一郎 : (1948) 血液カタラーゼの研究 I. 医学と生物学, **13**, 279.