

フラビンとメトヘモグロビン血症

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/8769

フラビンとメトヘモグロビン血症

金沢大学医学部生化学第一講座 (主任: 米山良昌教授)

(指導: 指吸俊次講師)

松 木 孝 澄

(昭和54年2月1日受付)

本論文の一部は、第17回国際血液学会(パリ, 1978)で発表した。

メトヘモグロビン(メトHb)は、ヘム鉄が3価になつていて、 O_2 と結合できないヘモグロビン(Hb)である。このメトHbは通常正常赤血球中には全Hb中1%以下であるが、何等かの原因で数%以上に増加した状態を、メトHb血症という。メトHb血症の原因にはイ) 遺伝性チトクローム b_5 還元酵素欠損、ロ) アスピリン、フェナセチン、亜硝酸等の薬物による中毒、ハ) ヘモグロビンM症がある¹⁾。正常赤血球では、酵素的及び非酵素的な系により、生成されたメトHbが常時還元されて2価鉄のHbとなる。中でもNADH-メトHb還元酵素系(チトクローム b_5 還元酵素系)は主な還元系である²⁾⁻⁴⁾。しかし遺伝性メトHb血症では、NADPH-メトHb還元酵素系やNAD(P)H-グルタチオン還元酵素系も重要な還元系とされている^{5), 6)}。最近、指吸ら^{7), 8)}はNADPH-メトHb還元酵素を精製し、フラビン還元酵素であることを明らかにした。この酵素系による電子の流れは、NADPH→フラビン還元酵素→フラビン→メトHbである。またヒト赤血球溶血液に、リボフラビン(FR), FMN, FADを加えると、メトHbの還元が促進されることも発見した。本論文では、メトHb還元に対するフラビンの効果を、赤血球でのNADPH-フラビン還元酵素の役割と関連して研究した結果を報告する⁹⁾。

材料と方法

I) 材料と試薬

正常ヒト赤血球はACD血液から調製した。NADH-チトクローム b_5 還元酵素欠損(遺伝性メトHb血症)患者赤血球は、患者の同意を得て採血した血液(ヘパリン血)より調製した。試薬類はすべて市販の特級のものを用いた。

II) メトヘモグロビンを含む赤血球浮遊液の調製

赤血球内HbはJaffe¹⁰⁾の方法により、亜硝酸ナトリウムで酸化し、メトHbとした。亜硝酸処理赤血球は、5倍量の0.9% NaCl(4℃)で6回洗滌し、等張緩衝液(92.4mM NaCl, 24.3mM Na_2HPO_4 , 5.7mM NaH_2PO_4 , 5mM KCl, 1mM $MgCl_2$, 0.5mM $CaCl_2$, pH 7.4)に浮遊した。赤血球浮遊液のヘマトクリット値は33%とした。赤血球内酵素の基質(D-グルコース, 2-デオキシ-D-グルコース, 乳酸ソーダ)および試薬(FR, アテプリン, メチレンブルー)は、あらかじめ上述の等張液に溶解して用いた。孵置は37℃, 空気中でおこなった。詳しい実験条件は図の説明を参照されたい。

3) メトヘモグロビン量の測定

赤血球内メトヘモグロビン量の測定は、Evelynら¹¹⁾の方法に依っておこなった。

成 績

[I] 10mM D-グルコース中で、亜硝酸処理赤血球内メトHbの還元をみた場合

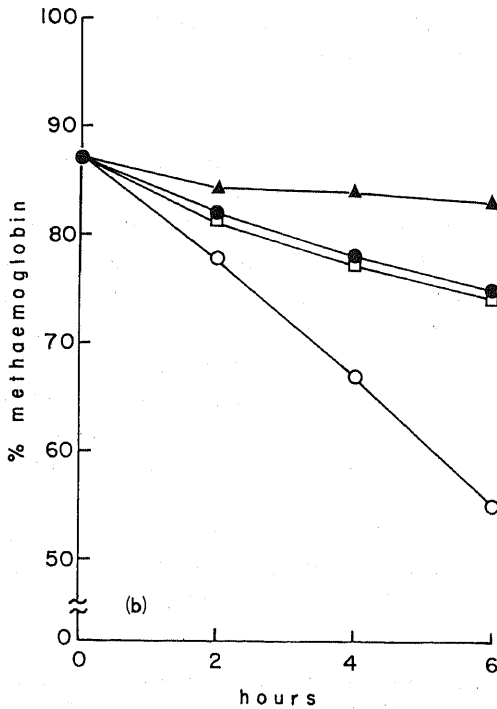
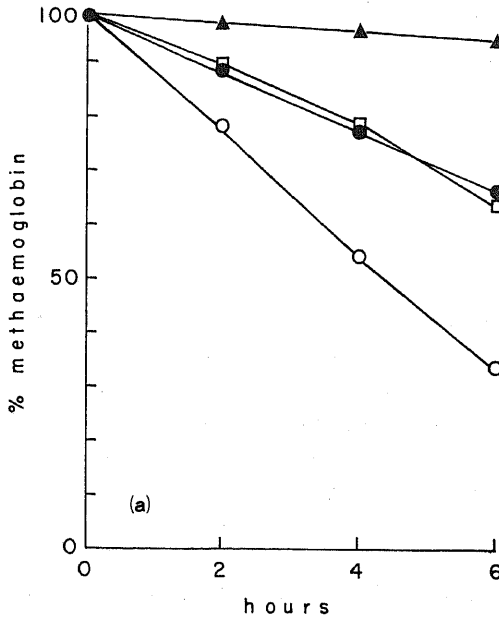
正常、患者(チトクローム b_5 還元酵素欠損)いずれの赤血球でも、メトHbは最初の6時間の孵置によってほぼ直線的に還元されて、オキシヘモグロビンとなった。また0.2mMのFRを加えることにより、正常、患者血球ともメトHbの還元が約3倍促進された。そして、このFRによる促進効果は、2mM アテプリンの共存下に消失した(図1a, 1b)。このようなFRによるメトHb還元の促進は、FRの濃度に依存する結果が得られた(図1c)。

[II] 10mM 2-デオキシ-D-グルコース中で、亜硝酸処理赤血球内メトHbの還元をみた場合。

正常及び患者赤血球で、メトHbは[I]の場合と同

Flavin and Methemoglobinemia, Takasumi Matsuki. Department of Biochemistry (Director: Prof. Y. Yoneyama, Assistant Prof. T. Yubisui), School of Medicine, Kanazawa University.

様に還元されてオキシHbになった。また0.2mM FRによりメトHbの還元が約3倍促進され、さらに2mMのアテブリンを加えることにより、FRによる還



元の促進は消失した(図2a,2b).

〔Ⅲ〕10mM 乳酸ソーダ中で、亜硝酸処理正常赤血球を孵置した場合

0.2mM FR, 1μM メチレンブルーによるメトHb還元促進作用はみられなかった(図3).

〔Ⅳ〕亜硝酸処理していない患者赤血球を10mM グルコース中に孵置した場合

0.1mM FR添加により、血球内メトHbは6時間の孵置で19.2%から7.1%に減少した。この場合のメトHb還元速度が、亜硝酸処理血球より遅い(図1b)のは、還元系酵素の基質としてのメトHb濃度が低いことによるものであろう(図4).

考 察

2-デオキシグルコースは、哺乳類の赤血球で、NADPH産生系の基質として利用され、その際に産生されるNADHはほとんど無視できるほどである^(12,13)、つまり2-デオキシグルコースは、FRによるメトHb

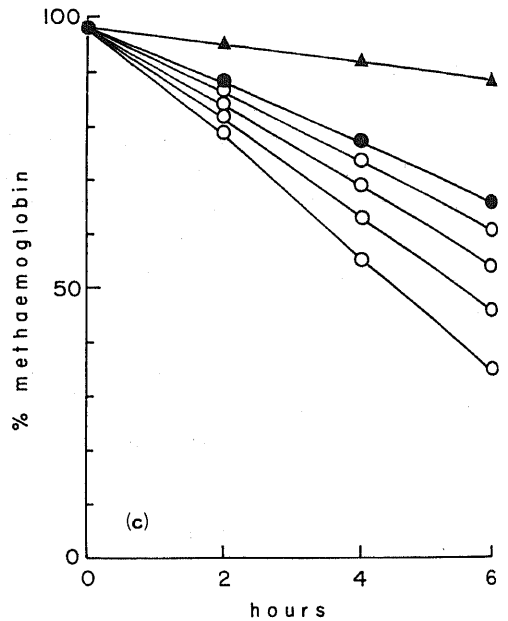


図1 (1a, 1b, 1c) : 10mM グルコースを含む生理的溶液中での赤血球内メトヘモグロビン還元
a) 正常赤血球, b) 患者赤血球 (▲) 対照, グルコース (-), (●) グルコース (+), (○) グルコース (+), 0.2mM リボフラビン (+), (□) グルコース (+), 0.2mM リボフラビン (+), 2mM アテブリン (+). c) 正常赤血球 (▲) 対照, (●) グルコース (+), (○) グルコース (+), 12, 60, 120, 300 μM リボフラビン (+).

還元促進がNADHに依存しているのかNADPHに依存しているのかを知るうえで、非常に有用である。結果に示されているように、

I) 赤血球を2-デオキシグルコース中に解置した場合も、FRによるメトHb還元促進は同程度である(図1, 図2)

II) 哺乳類赤血球内でNADHを産生し、NADPHを産生しない乳酸の存在下¹⁴⁾に赤血球を解置した場合、FRでもメチレンブルーによっても、メトHb還元促進が認められなかった(図3)

III) 正常赤血球ばかりでなくNADH-メトHb還元酵素の欠損している患者赤血球でも同様の結果が得られた(図1b, 図2b)。以上のことから、リボフラビン(FR)によるメトHb還元促進は、NADH生成系ではなく、NADPH生成系に依存していると考えられる。

先に指吸^{11,12)}はNADPH-メトHb還元酵素が一種のフラビン還元酵素であると報告した。この場合前述のようにNADPHよりフラビン還元酵素によって

フラビンに電子が移り、還元フラビンがメトHbを還元するわけである。実際、ヒト溶血液やこの酵素の再構成系では、フラビン添加によりメトHb還元が促進される^{17,18)}。ところが、I) 赤血球内の正常のフラビンの量が1~2 μ Mなのに対して、NADPH-フラビン還元酵素のフラビンに対するミカエリス定数、Kmは約50 μ M⁷⁾であること、2) NADPHやNADP⁺のこの酵素に対する解離定数(Kd)がいずれも約10⁻⁸Mで、あまり差がないこと¹⁹⁾などから、生理的状态ではこの酵素があまりメトヘモグロビン還元酵素としては作用していないとも考えられる。しかし、リボフラビンが赤血球膜を透過し、赤血球内濃度が増すことによって、このNADPH-フラビン還元酵素が活性化されることが想像される。図1にみられるように、FRによるメトHb還元促進が、解置液中のFR濃度(12 μ M~300 μ M)に依存しており、又FRの拮抗剤であるアテブリンによってメトHb還元促進が消失することから、1) 赤血球中のFR濃度が添加したFRによって増

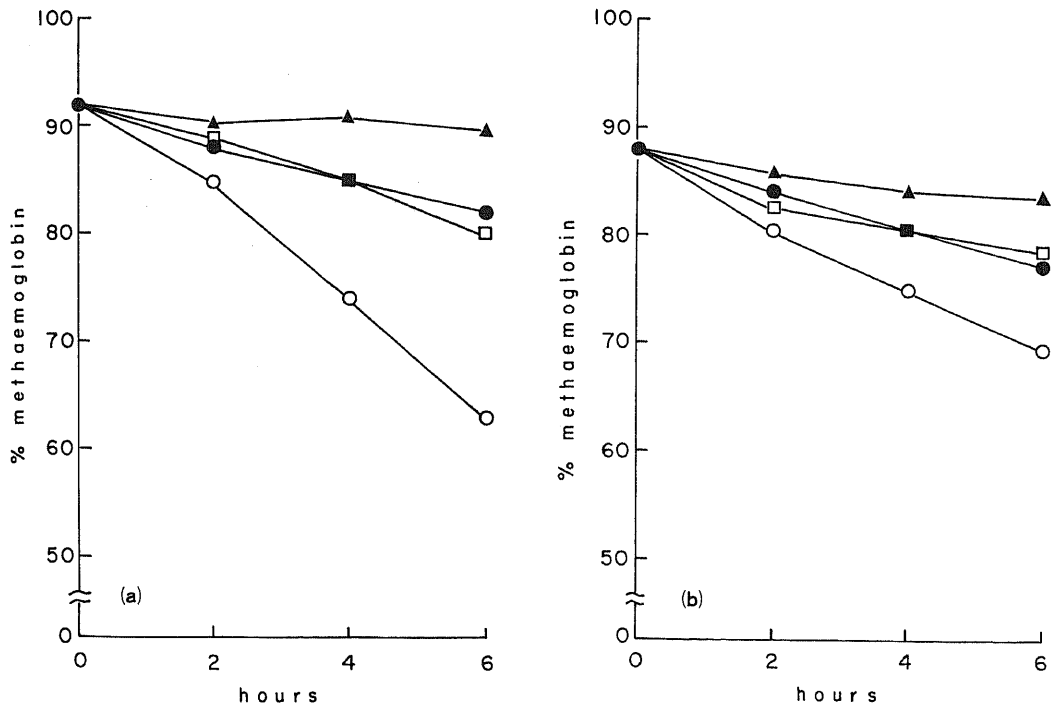


図2 (2a, 2b) : 10mM 2-デオキシグルコースを含む生理的溶液中での赤血球内メトヘモグロビン還元

a) 正常赤血球, b) 患者赤血球 (▲) 対照, 2-デオキシグルコース (-), (●) 2-デオキシグルコース (+), (○) 2-デオキシグルコース (+), 0.2mMリボフラビン (+), (□) 2-デオキシグルコース (+), 0.2mMリボフラビン(+), 2mMアテブリン (+)

加し、II)その結果NADPH-フラビン還元酵素が活性化され、メトHb還元が促進されと考えられる。しかし、赤血球内のフラビン酵素であるNADPH-グルタチオン還元酵素³⁾が、フラビンによるメトHb還元の促進に関与している可能性も全くは否定できない。

チトクロームb₅還元酵素欠損症や中毒性メトHb血症患者では、NADPH-メトHb還元酵素(NADPH-フラビン還元酵素)がメトHbの還元において一定の役割をになっている^{5),6)}。そのためこれらの患者の治療にはアスコルビン酸やメチレンブルーが用いられてきた。メチレンブルーは五単糖回路を活性化し、NADPHの供給を増すので有効である¹⁷⁾。しかし溶血性貧血など種々の副作用も強い。一方アスコルビン酸は、メトHbの還元速度が遅いうえに、尿路結石をおこしやすい人や下痢患者、そして妊婦などでは長期間の連続投与ができない¹⁸⁾。また0.1mMメチレンブルー又は10mMアスコルビン酸ソーダを添加した10mMグルコースを含む等張緩衝液中で赤血球を2時間孵置した実験で、孵置液の一部を採取して得た溶血液に670nmに吸収極

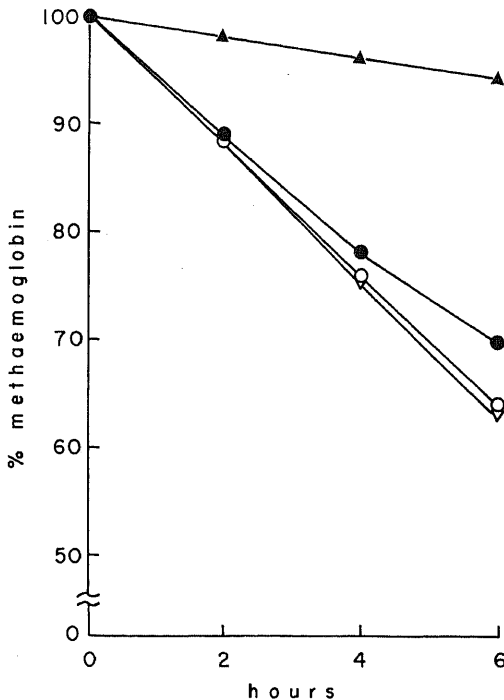


図3 10mM乳酸を含む生理的溶液中での赤血球内メトヘモグロビン還元(正常赤血球)(▲)対照, 乳酸(-), (●)乳酸(+), (○)乳酸(+), 0.2mMリボフラビン(+), (▽)乳酸(+), 1 μ Mメチレンブルー(+)

大をもつ、変性ヘモグロビンを示す吸収があらわれる²⁰⁾。この吸収は300 μ M FR添加6時間孵置では見出しされない。

また最近Kaplanら²¹⁾は2例の遺伝性メトHb血症患者で、リボフラビン投与による治療を試み、良い成績を得ている。水溶性ビタミンとはいえ、長期連用による副作用があるかどうかはこれからの問題であろう。

以上のことから、生理的物質の水溶性ビタミンであるリボフラビンは、場合によってはメチレンブルーやアスコルビン酸よりも、遺伝性メトHb血症や中毒性メトHb血症の治療に有用であると思われる。

結 論

1. 正常あるいは遺伝性メトヘモグロビン血症患者よりの赤血球のヘモグロビンを酸化し、これらの赤血球を、グルコースあるいは2-デオキシグルコースを含む等張緩衝液に浮遊すると、リボフラビンの添加により、リボフラビンの濃度に依存して、メトヘモグロビン還元の促進がみられた。

2. このフラビンによるメトヘモグロビン還元の促進作用は、NADPH-メトヘモグロビン還元酵素(NADPH-フラビン還元酵素)系を活性化することに

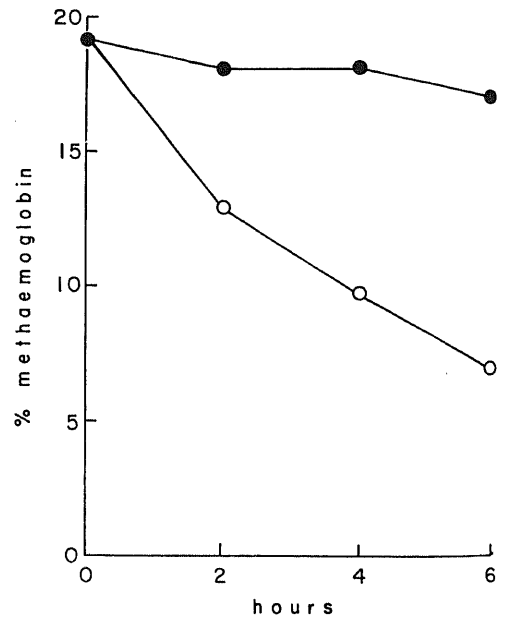


図4 亜硝酸末処理、患者赤血球内メトヘモグロビン還元(●)10mMグルコース添加, (○)10mMグルコース, 0.2mMリボフラビン添加

よると考えられる。

3. 水溶性ビタミンであるリボフラビンは、遺伝性メトヘモグロビン血症や中毒性メトヘモグロビン血症の治療に有用である。

御導、御校閲を戴いた、米山良昌教授・並びに指吸俊次講師、いろいろ討論していただいた医療短大竹下教授、生化学第一講座友田講師その他の方々、患者血液の入手に御援助頂いた第1内科小林講師、谷博士、名古屋保健衛生大学内科平野助教授等の方々に感謝いたします。

また本研究の一部は文部省科学研究費(No.212003.287032)、厚生省難病研究費、三島海雲記念財からの援助によって行なわれた、記して謝意を表します。

文 献

- 1) 竹下正純・米山良昌：メトヘモグロビン還元について、医学のあゆみ、102, 581 - 588 (1977).
- 2) Scott, E.M., Duncan, I.W. & Ekstrand, V. : The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human erythrocytes. J. Biol. Chem., 240, 481 - 485 (1965).
- 3) Sugita, Y., Nomura, S. & Yoneyama, Y. : Purification of reduced pyridine nucleotide dehydrogenase from human erythrocytes and methemoglobin reduction by the enzyme. J. Biol. Chem., 246, 6072 - 6078 (1971).
- 4) Hultquist, D.E. & Passon, P.G. : Catalysis of methaemoglobin reduction by erythrocyte cytochromb b₅ and cytochrome b₅ reductase. Nature: New Biology, 229, 252 - 254 (1971).
- 5) Kiese, M. : Methemoglobinemia : A Comprehensive Treatise, p12 - 35, CRC Press, Cleveland, Ohio, 1974.
- 6) Jaffé, E. R. : The formation and reduction of methemoglobin in human erythrocytes, p345 - 376. In H. Yoshikawa & S. Rapoport(ed.), Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes, University of Tokyo Press, Tokoy, 1976.
- 7) Yubisui, T., Matsuki, T., Tanishima, K., Takeshita, M. & Yoneyama, Y. : NADPH-flavin reductase in human erythrocytes and the reduction of methemoglobin through flavin by the enzyme. Biochem. Biophys. Res. Commun., 76, 174 - 182 (1977).
- 8) 指吸俊次：ヒト赤血球のNADPH - フラビン還元酵素の精製とその性質。十全医学会誌, 87, 428 - 435 (1978).
- 9) Matsuki, T., Yubisui, T., Tomoda, A., Yoneyama, Y., Takeshita, M., Hirano, M., Kobayashi, K. & Tani, Y. : Acceleration of methaemoglobin reduction by riboflavin in human erythrocytes. British J. Haematol., 39, 523 - 528 (1978).
- 10) Jaffé, E. R. : The reduction of methemoglobin in erythrocytes of a patient with congenital methemoglobinemia, subject with erythrocyte glucose-6-phosphate dehydrogenase deficiency, and normal individuals. Blood, 21, 561 - 572 (1963).
- 11) Evelyn, K. A. & Malloy, H. T. : Micro-determination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. J. Biol. Chem., 126, 665 - 662 (1938).
- 12) Schmidt, F.G., Schwarz, R.T. & Scholtissek, C. : Nucleoside-diphosphate derivatives of 2-deoxy-D-glucose in animal cells. Europ. J. Biochem., 49, 237 - 247 (1974).
- 13) Broks, S.A., Lawrence, J.C. & Ricketts, C.R. : Phosphate esters produced by mammalian skin from 2-deoxy-D-glucose. Nature, 187, 1028 - 1029. (1960).
- 14) Waller, H. D. & Lohr, G. W. : Beitrag zur idiopathischen Methämoglobinämie. Folia Haematol., 78, 588 - 599 (1962).
- 15) Matsuki, T. : Unpublished data (1977).
- 16) Beutler, E. : Effect of flavin compounds on glutathione reductase activity: in vivo and in vitro studies. J. Clin. Invest., 48, 1957 - 1966 (1969).
- 17) Metz, E.N., Balcerzak, S.P. & Sagone, A.L., Jr : Mechanisms of methylene blue stimulation of the hexose monophosphate shunt in erythrocytes. J. Clin. Invest., 58, 797 - 802 (1976).
- 18) Goluboff, N. & Wheaton, R. : Methylene blue induced cyanosis and acute hemolytic anemia complicating the treatment of methemoglobinemia. J. Pediatrics, 58, 86 - 89 (1961).
- 19) Burns, J.J. : Ascorbic acids, p 1564 - 1569. In L. S. Goodman & A. Gilman(ed.), The pharmacological basis of therapeutics, 5th ed. Macmillan, New York, 1975.
- 20) Matsuki, T. : Unpublished data (1978).
- 21) Kaplan, J.C. & Chirouze, M. : Therapy of recessive congenital methaemoglobinaemia by oral riboflavine. The Lancet, II, 1043 - 1044 (1978).

Flavin and Methemoglobinemia. Takasumi Matsuki, Department of Biochemistry, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa, 920, Japan. *J. Juzen Igk. Z.*, 88, 233-238 (1979).

Abstract

Flavin and Methemoglobinemia

Takasumi Matsuki, Department of Biochemistry (Director: Prof. Y. Yoneyama and Asistant Prof. T. Yubisui), School of Medicine, Kanazawa University

- 1) In normal or hereditary methemoglobinemic human erythrocytes, riboflavin accelerated the reduction of methemoglobin in the presence of glucose or 2-deoxy-glucose in vitro. The acceleration was dependent on the concentration of riboflavin in the incubation mixture.
- 2) The acceleration of methemoglobin reduction by riboflavin is considered to be due to the activation of NADPH-methemoglobin reductase, i.e. NADPH-flavin reductase in erythrocytes by the reagent.
- 3) Ribflavin must be useful to treat some patients with either hereditary methemoglobinemia or toxic methemoglobinemia.