

メトヘモグロビン血の酸素平衡について

金沢大学大学院医学研究科生理学第一講座(主任 齋藤幸一郎教授)

宮 下 敏

(昭和44年2月8日受付)

本論文の要旨は1967年9月第13回および1968年11月第14回生理学中部談話会において発表した。

ヘモグロビン(Hb)はその1分子中に2価の鉄原子(ヘム鉄)4個を持ち、これらの鉄原子が酸素と可逆的に結合して、各組織に酸素を供給するという重要な生理作用を営んでいる。

Hbは酸化されるとメトヘモグロビン(Met-Hb)を生ずる。赤血球内にMet-Hbの増加する疾患として、異常Hbの1種であるヘモグロビンM症^{1)・3)}(HbM症)とMet-Hb血症の2つが挙げられる。

赤血球内ではHbの酸化還元反応は常時一定の平衡を保ち、正常赤血球ではMet-HbはHb全量の1%前後である⁴⁾。しかし、この反応が酸化反応の亢進、または還元反応の低下を来した場合、何れの場合もMet-Hbは増加しMet-Hb血症を生ずる。

先天性Met-Hb血症患者の血液についての酸素平衡に関する研究は少ない^{5)・8)}。

著者は試験管内で人工的にMet-Hb血を作り、そのHbの酸素平衡および酸化Hbと正常Hb間の酸化還元反応を検討するため、酸素解離曲線に関するHill式⁹⁾のnとP₅₀を指標にして、若干の実験を行ない、2~3の所見を得たのでここに報告する。

本論文の用語について、Hbの酸化はMet-Hb化の意味に用い、また酸化HbはMet-Hb化したHbを意味し、酸素化Hb(oxygenated Hb)と区別して用いたことを念のため記しておく。

実験材料および実験方法

実験材料として、ヘパリンを終末濃度3300 unit/1の割合に加えたウシ血液を用いた。

I. Met-Hbの作成法

Met-Hbの作成法としては、K₃Fe(CN)₆添加法¹⁰⁾、NaNO₂添加法¹⁰⁾¹¹⁾、低pO₂下におけるHbの酸性化による方法¹²⁾等がある。著者は赤血球膜を容易に通過して、HbをMet-HbにしうるNaNO₂添加

法を用いた。0.145M濃度のNaNO₂溶液(氷点降下度0.57°C)を使用した。

II. Met-Hbの還元阻止方法

全血にNaNO₂を添加してHbを酸化すると、NaNO₂添加後時間の経過に伴い、一旦酸化したHbが漸次還元していく現象を示す。著者はMet-Hbの還元阻止の目的で、この還元反応のエネルギー源となっている解糖を抑制するNaFを還元阻止剤として用い、血液1ml当り3mg以上のNaF添加で目的をはたすことができた(実験成績参照)。それ故、著者は実験7~11に用いた血液および血液に添加する生理的食塩水、緩衝液、NaNO₂溶液等全てに5mg/mlのNaFを加えた。

III. Met-Hb量の測定法

1. 正常Hbと部分酸化Hb(Hb分子を部分的に酸化したもの)の酸素容量の差より算出する方法で、酸素容量測定にはVan Slyke & Neilの測圧式血液ガス分析器を用いた。

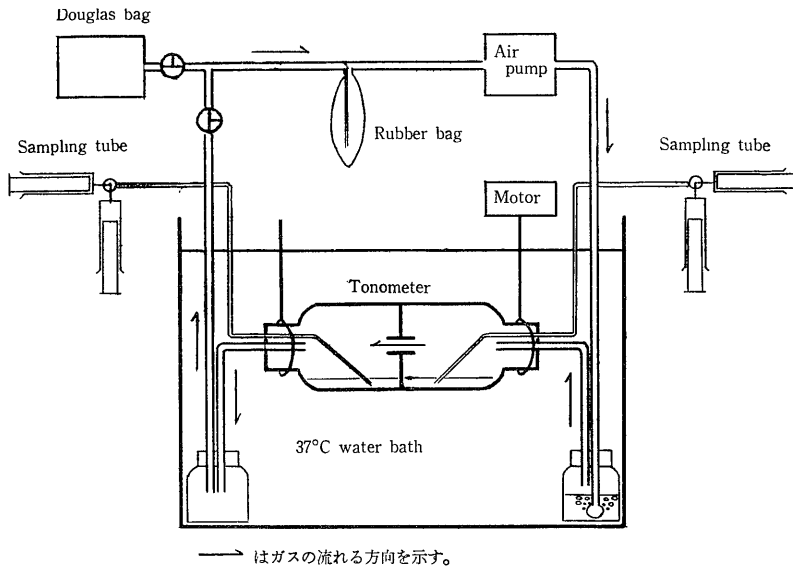
2. Evelyn-Malloyの方法¹³⁾¹⁴⁾により、Hitachiのphotoelectric spectrophotometerを用いて測定した。これはMet-Hbが630mμで特有の吸収帯を持つことを利用したものである。

IV. Hbの酸素解離曲線の作製法

図1に示す全体容量約1200mlの血液ガス平衡回路中¹⁵⁾の、中央に隔壁を有する容量300mlのトノメーターの一侧に、予め準備した部分酸化Hb血液あるいは完全酸化Hb-正常Hb混合血液を6ml注入する。一方、他側には対照として正常Hb血液を6mlだけ入れる。これをCO₂-N₂-O₂混合ガスで37°C、30分間完全に平衡させた。この混合ガスの組成は、そのpCO₂が血液試料の血漿pHを約7.40および赤血球内pHを約7.20にならしめるように、またpO₂については最初の試料を約20mmHgで平衡させ、次

Oxygen Equilibrium of Methemoglobin-containing Blood. Satoshi Miyashita, Department of Physiology (I) (Director: Prof. K. Saito), School of Medicine, Kanazawa University.

図1 血液ガス平衡装置



で回路中の pO_2 を約 10 mmHg 高めて 2 番目の試料を平衡させた。このように平衡毎に回路中の pO_2 を約 10 mmHg づつ高めていくことにより、20~50 mmHg 範囲内で pO_2 を異にする 4 点の試料を得るように、試行錯誤的に調製した。最後に、回路中にて 37°C の空気と 30 分間平衡させ、完全に酸素と飽和した血液試料を作り、酸素容量を測定した。

それぞれの平衡ガスはガス採取管に採り、 pCO_2 および pO_2 測定に供した。また、それぞれの平衡血液試料は、予め水銀で死腔を満たした注射器に気密下に採り、その pCO_2 、 pO_2 および CO_2 、 O_2 含有量、pH の測定に供した。平衡ガスの pCO_2 、 pO_2 は Scholander ガス分析器で 2 回づつ測定、平衡血液試料の pCO_2 、 pO_2 、pH はそれぞれ Beckman physiological gas analyzer model 160 の CO_2 電極、 O_2 電極、ガラス電極で、37°C にて 2 回づつ測定した。血液 CO_2 および O_2 含有量、酸素容量の測定には、Van Slyke & Neil の血液ガス分析器を用いた。

このようにして得た測定値より、血液に対する酸素の Bunsen の吸収率を 0.0237¹⁶⁾ として、それぞれの試料の酸素飽和度 (sO_2 %) を求めた。個々の血液試料の pH は 7.30~7.50 の間にあって必ずしも、7.40 ではないから、Bohr 効果係数¹⁷⁾ $d \log PO_2/d pH = -0.54$ ¹⁸⁾ を用いて、pH 7.40 における pO_2 を求めた。また、Hb 溶液を試料とした場合には、その pH は 7.10~7.30 の間にあり、測定された pO_2 はこの Bohr 効果の値を用いて、pH 7.20 における値に補正を行なった。

部分酸化 Hb 血液、完全酸化 Hb-正常 Hb 混合血液および正常 Hb 血液の酸素容量を $sO_2=100\%$ として、それぞれの pO_2 に対する結合 O_2 含有量を sO_2 % で示すと、酸素解離曲線は Hill の経験式⁹⁾,

$$\frac{y}{100} = \frac{K P^n}{1 + K P^n} \quad (1)$$

で表わせる。ここで y は sO_2 %, P は平衡 pO_2 mmHg である。(1) 式はまた、次のように書き表わされる。

$$\log P = \frac{1}{n} \log \frac{1}{K} + \frac{1}{n} \log \frac{sO_2}{100 - sO_2} \quad (2)$$

sO_2 が 50% の時の P を P_{50} で表わすと、

$$\log P = \log P_{50} + \frac{1}{n} \log \frac{sO_2}{100 - sO_2} \quad (3)$$

となる。

sO_2 が $20 < sO_2 < 80$ の範囲内にある時は、 $\log \frac{sO_2}{100 - sO_2}$ と $\log P$ の間に直線関係が成立する(図 5 参照)。実験成績より最小自乗法により、この直線の方程式を求め、 $sO_2 50\%$ 、すなわち、 $\log \frac{sO_2}{100 - sO_2}$ が 0 なる直線上の点より P_{50} を、この直線の $\log P$ 軸に対する傾斜より n の値を算出した。 n はヘムヘム相互作用を表わす定数、 P_{50} は Hb の酸素親和性を表わす尺度となる。

V. 血液の溶血度測定法

血液試料を 8000 r.p.m. 10 分間遠心分離し、その上清をとり、Hitachi の spectrophotometer を用いて、cyanomethemoglobin 法で Hb 濃度 A を測定する。次に同一試料そのものの Hb 濃度 B を測定し、 $100 \times \frac{A}{B}$ を以てその試料の溶血度 (%) として表わした。

実験結果

I. Hb の酸化還元反応

NaNO₂ で Hb を部分的に酸化した全血 および 溶血血液を、37°C 恒温槽内の トノメーターに入れて、酸素が充分存在する場合と全く存在しない場合の 2通りの条件下において、Hb の酸化還元反応を比較検討した。Met-Hb 量測定には Evelyn-Malloy の方法を用いた。

実験 1: 部分酸化 Hb 全血の酸化還元反応

全血に、その Hb の 60%前後を酸化しうだけの NaNO₂ を加え、溶血しないように攪拌して二分する。一方を空気で、他方を N₂ ガスで充分平衡させながら、5時間にわたり1時間毎に試料を採取して、Met-Hb 量を測定した。

その結果、図 2-a に示す如く、時間の経過に伴ない、Met-Hb がかなり一定した速度で還元していっ

た。NaNO₂ 添加直後より 5時間にて、全 Met-Hb 量の約 1/2~1/4 が還元した。また、酸素の有無は Met-Hb の還元速度に、明白な差異を生ぜしめていなかった。

実験 2: 部分酸化 Hb 溶液の酸化反応 (1)

実験 1 と同様の方法で酸化した血液を、最小必要量の saponin で溶血し、消泡剤として octyl alcohol を数滴添加して、実験 1 と同様の実験を行なった。

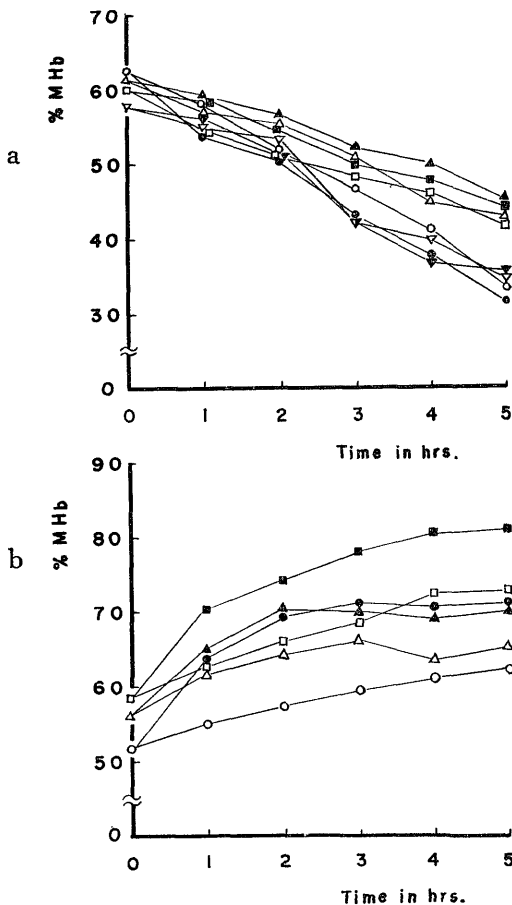
図 2-b に示すように、NaNO₂ 添加後の時間の経過に伴ない、実験 1 とは逆に Hb の酸化が進行していった。とくに添加直後より 1時間に、Hb の酸化はかなり急速に進行するが、3時間以上保温していると、酸化への進行は減退もしくは停止してくる。この際、酸素の有無による Hb の酸化程度の差異は著明で、無酸素状態に保温した方が酸化の進行が大きかった。

実験 3: 部分酸化 Hb 溶液の酸化還元反応 (2)

溶血血液において酸化が進行するが、それが血漿混入に起因するか否かを検討した。

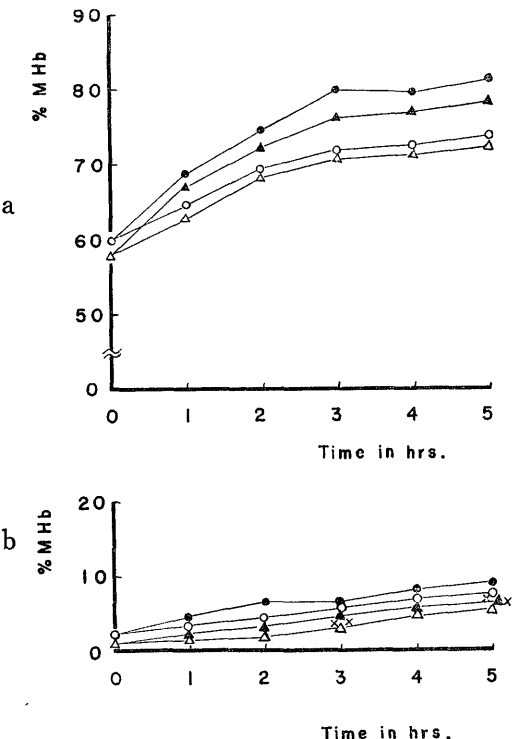
遠心分離により血漿を除去し、生理的食塩水で置換したものを saponin で溶血した後、実験 2 と同様の

図 2 部分酸化 Hb 血の還元および酸化速度



a 部分酸化 Hb 全血 b 部分酸化 Hb 溶液
 ○ 有酸素状態 ● 無酸素状態

図 3 部分酸化 Hb および正常 Hb 溶液の酸化速度



a 部分酸化 Hb 溶液 b 正常 Hb 溶液
 ○ 有酸素状態 ● 無酸素状態
 b 図の×印は濃厚な Hb 溶液の測定値を示す。

測定を行なった。

その結果 (図 3-a), NaNO_2 添加後の時間の経過に伴ない, Hb の酸化が進行していった。また, 無酸素状態で保温した方が酸化の進行が大であった。

実験 4: 正常 Hb 溶液 (溶血血液) の酸化還元反応
全血を saponin で溶血して同様の実験を行なった。その結果 (図 3-b), 時間の経過に伴ない, 正常 Hb が漸次酸化していったが, この場合においても無酸素状態の方が酸化の進行程度はやや大であった。

実験 5: 濃厚な Hb 溶液の酸化還元反応
Hb の濃度が酸化 Hb 発現速度に関与するか否かを検する目的で, 血液を遠心分離して血漿を除去した赤血球を, saponin で溶血した。しかるのち空気と平衡させ, 実験 4 との異同を検した。その結果を図 3-b の ×印で示したが, 実験 4 の成績とはほぼ一致した。

II. Met-Hb の還元阻止剤としての NaF の効果
全血に含まれる Met-Hb の還元を阻止する目的で, 解糖阻止剤の 1 つである NaF の Met-Hb 還元阻止効果を検した。

実験 6: NaF 添加量による還元阻止状態
予め NaF を血液 1 ml 当り 1~10 mg ずつ加え, さらに NaNO_2 を適量加えて, その Hb の 30~80% を酸化したのち, 37°C トノメーター中にて空気と平衡させながら 5 時間保温して, Met-Hb の還元程度を酸素容量を指標にして検した。

その結果, 血液 1 ml 当り 1 mg の NaF では依然として Met-Hb の還元を認めるが, 3 mg 以上では 30~90 分以後には全く還元を認めなかった。その実験例を図 4-a と b に示した。この図は NaF 添加に伴なう Met-Hb の還元の有無を, 酸素容量の時間の経過で表わしてある。

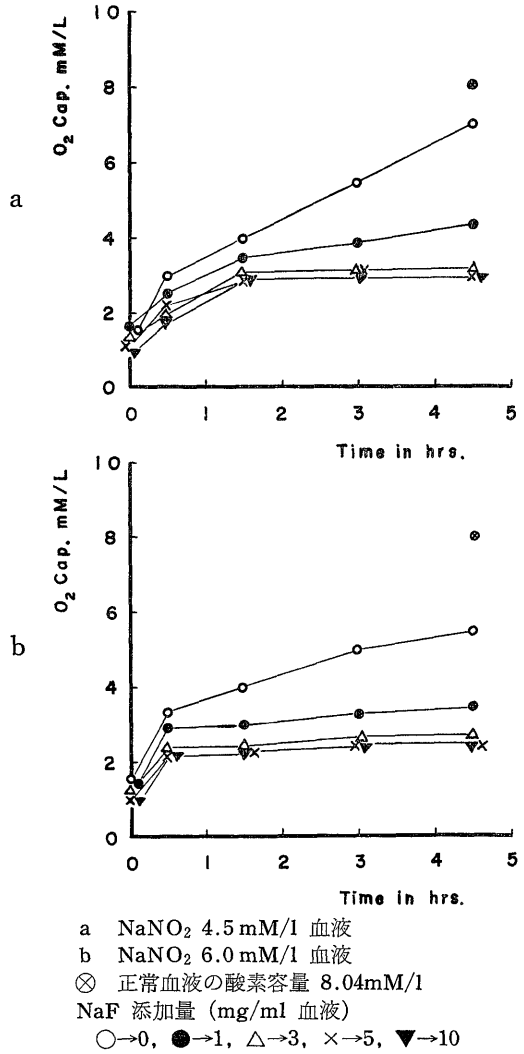
III. 部分酸化 Hb 全血および完全酸化 Hb-正常 Hb 混合 (溶液, 全血, 赤血球浮遊液) の酸素解離曲線

Hill 式の n と P_{50} を指標にして, 酸素解離曲線の形および位置, さらに完全酸化 Hb と正常 Hb の相互間の酸化還元反応について検討した。

実験 7: 部分酸化 Hb 全血の酸素解離曲線
全血に NaNO_2 を適量滴下して, 任意の程度の部分酸化 Hb 全血を作り, トノメーターの一侧に注入した。他側に正常全血を対照として入れて, 実験方法の項で記した要領で実験を行なった。その酸素解離曲線より n と P_{50} を求めた。

表 1 は Hb の部分酸化の程度が 2.5~78.5% にわたる実験例を, 酸化程度の順に列挙したものである。2.5% 部分酸化 Hb の n は 2.81, P_{50} は 29.7 mmHg であり, 対照の正常全血の n は 2.89, P_{50} は 29.6

図 4 NaF 添加量と Met-Hb の還元速度の関係



mmHg である。 n と P_{50} について部分酸化 Hb 全血を対照の正常全血の百分率で表わすと, n は 97.6%, P_{50} は 100.3% となる。この百分率は部分酸化 Hb と正常 Hb の n と P_{50} を相対的に表わすもので, それぞれの測定値を比較するのに適している。それ故, 以下のすべての実験例について同様の記載を行なった。

図 5-a は 1 実験例の酸素解離曲線を図示したものである。 b は縦軸に $\log \frac{sO_2}{100-sO_2}$ を, 横軸に $\log pO_2$ をとって a を表わしたものである。 b の直線の傾斜は n 値を示し, sO_2 50% なる直線上の点より P_{50} を求めた。

表 1, 図 6 は Hb の部分酸化が増加するに伴ない, n および P_{50} ともに漸減していくのを示している。

図中の点線（以後この点線で表わした曲線を、n およ
び P₅₀ の対照曲線と名称する）の如く、n は曲線的
に、P₅₀ はほぼ直線的に減少する。ここで、P₅₀ の回
帰直線を求めると、

$$Y = 99.7 - 0.449X \quad (r = -0.920)$$

で表わされる。Y は（部分酸化 Hb の P₅₀/対照の正
常 Hb の P₅₀）×100 を、X は Hb の酸化百分率を

示す。

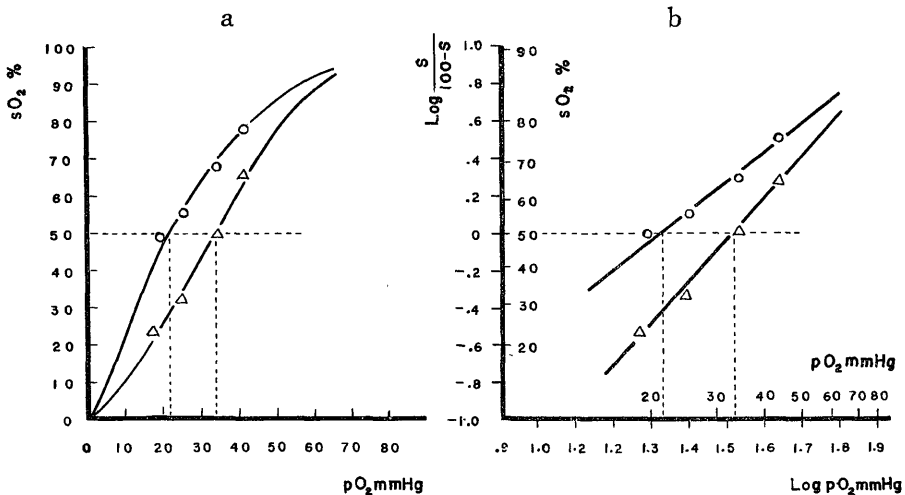
また、この実験より、NaNO₂ により形成される Met
-Hb 量の関係を算出した。表 2 より、1M の NaNO₂
により作られる Met-Hb の量は 1.14±0.24M とな
った。

実験 8：完全酸化 Hb-正常 Hb 混合溶液の酸素
解離曲線

表 1 部分酸化 Hb 全血と正常 Hb 全血の n, P₅₀ 値とその百分率

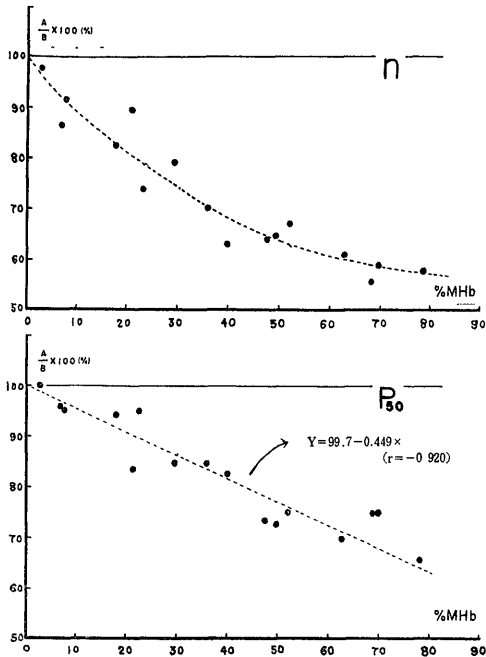
No.	A) 部分酸化 Hb 全血			B) 正常 Hb 全血		$\frac{A}{B} \times 100(\%)$	
	MetHb(%)	n	P ₅₀ mmHg	n	P ₅₀ mmHg	n	P ₅₀
1	2.5	2.81	29.7	2.89	29.6	97.6	100.3
2	7.0	2.58	30.8	2.98	32.1	86.6	96.0
3	7.5	2.66	29.8	2.91	31.3	91.4	95.2
4	18.0	2.29	31.0	2.78	33.0	82.4	93.9
5	20.9	2.44	26.7	2.72	31.9	89.7	83.7
6	23.1	2.11	30.2	2.86	31.8	73.8	95.0
7	29.5	2.29	29.9	2.89	35.4	79.2	84.5
8	36.1	2.22	28.1	3.16	33.0	69.9	84.4
9	40.0	1.87	27.1	2.87	32.8	65.5	82.6
10	47.7	1.79	24.3	2.60	33.0	68.8	73.6
11	49.0	2.07	23.0	2.97	31.7	69.7	72.6
12	52.0	2.18	25.2	3.26	33.1	66.9	75.7
13	55.3	1.53	21.3	2.37	33.0	64.6	72.5
14	62.9	1.71	23.6	2.80	32.5	61.1	72.5
15	68.5	1.55	27.5	2.80	36.6	55.4	75.1
16	69.5	1.61	24.3	2.75	32.3	58.5	75.2
17	78.5	1.81	20.4	3.14	33.8	57.6	60.3

図 5 部分酸化 Hb 全血 (Met-Hb 量 47.7%) と正常 Hb 全血の酸素解離曲線



○ 部分酸化 Hb 全血 △ 正常 Hb 全血
b の直線の勾配は n を表わし、sO₂ 50% における pO₂ は P₅₀ を表わす。

図6 部分酸化 Hb 全血と正常 Hb 全血の n, P₅₀ 値についての百分率



$\frac{A}{B} \times 100(\%)$ の A は部分酸化 Hb 全血の n および P₅₀, B は正常 Hb 全血の n および P₅₀ を表わす。
を対照曲線と名称し以後の図に使用した。

全血に過量の NaNO₂ を加え、24時間 0°C 冷蔵庫に放置して、Hb を完全に酸化した。しかるのち、生理的食塩水で遠心洗浄することにより、過剰の NaNO₂ を除去し、完全酸化 Hb 赤血球浮遊液(媒質: 生理的食塩水)とした。これを saponin で溶血して完全酸化 Hb 溶液とし、一方、全血の血漿も生理的食塩水で置換して、saponin で溶血して正常 Hb 溶液とした。この両者を 適当比に混合して、完全酸化 Hb-正常 Hb 混合溶液を作り、酸素解離曲線を描き n と P₅₀ を求め、正常 Hb 溶液のそれと比較した。

実験 2~5 において、溶血血液は時間の経過に伴ない、漸次酸化が進行するのを見た。それ故、酸化の進行を最小限にするため、今回の実験ではトノメーター平衡時間を10分間に限定した。また、pO₂の測定は試料溶液につき電極法で測定した。一方、Hb の酸化の進行程度を知るために、実験前後に Met-Hb 量を Evelyn-Malloy の法を用いて測定した。なお、Met-Hb の実験中の増加は、表 3 に示すように 3~5% とどまる。著者は実験後に測定した Met-Hb 量を、その酸素解離曲線の Met-Hb 量として図 7 を表わした。

表 3 および図 7 は混合酸化 Hb 量の増加に伴ない、n と P₅₀ ともに絶対値 および 相対値 (百分率) の低下を来しているのを示す。これを実験 7 の 対照曲線

表 2 NaNO₂ とそれにより形成される Met-Hb の量的関係

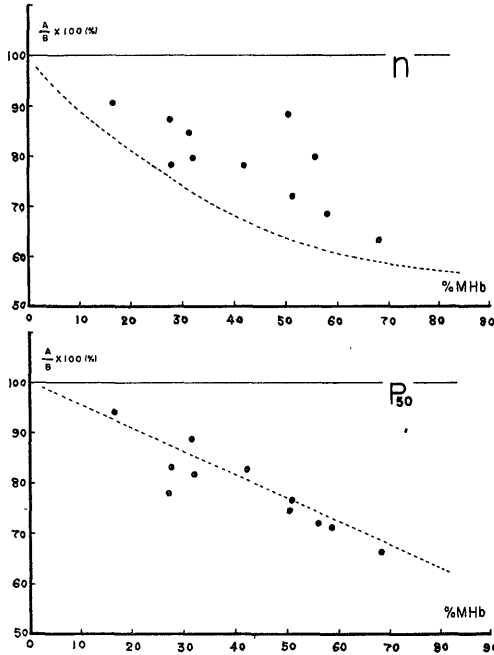
No.	形成された Met-Hb 量		Met-Hb / NaNO ₂ (Mol 比)
	酸素容量の減少量 (Vol%)	mM/L	
1	18.76	8.38	1.44
2	17.83	7.96	1.37
3	15.84	7.07	1.22
4	11.73	5.24	0.90
5	18.17	8.11	1.40
6	14.38	6.42	1.11
7	15.82	7.06	1.22
8	13.52	6.04	1.04
9	15.60	6.96	1.20
10	12.63	5.64	0.97
11	7.85	3.49	0.60
12	15.82	7.06	1.22
\bar{x}			1.14
S.D.			0.24

実験 7 の成績より、NaNO₂ により酸化される Met-Hb のモル比を算出した。
 0.145M NaNO₂ (NaNO₂ 1.0g/dl) 4ml を 100ml の血液 (加 NaF) に加えると、1M NaNO₂ より 1.14±0.24M の Met-Hb が形成される。

表3 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合溶液と正常 Hb 溶液の n, P₅₀ 値とその百分率

No.	A) 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合溶液				B) 正常 Hb 溶液		$\frac{A}{B} \times 100(\%)$	
	Met Hb (%)		n	P ₅₀ mmHg	n	P ₅₀ mmHg	n	P ₅₀
	実験前	実験後						
1	14.8	16.9	2.49	33.0	2.75	35.1	90.5	94.0
2	26.0	27.6	2.03	27.4	2.33	35.1	87.1	78.1
3	24.0	28.0	2.28	30.9	2.92	37.3	78.1	82.8
4	25.6	31.6	2.30	32.3	2.72	36.4	84.6	88.7
5	30.2	32.0	2.20	28.2	2.77	34.5	79.4	81.7
6	36.7	41.9	2.01	28.7	2.57	34.8	78.2	82.5
7	49.2	50.3	2.02	26.1	2.29	25.2	88.2	74.1
8	50.1	51.0	2.12	28.4	2.97	37.1	71.4	76.5
9	51.1	55.8	2.06	26.4	2.59	36.9	79.5	71.5
10	52.8	58.7	1.96	26.5	2.86	37.4	68.5	70.9
11	65.3	68.5	1.71	22.2	2.72	33.3	62.9	66.7

図7 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合溶液と正常 Hb 溶液の n, P₅₀ 値についての百分率



$\frac{A}{B} \times 100(\%)$ の A は完全酸化 Hb-正常 Hb 混合溶液の n, P₅₀ 値. B は正常 Hb 溶液の n, P₅₀ 値を表わす.
は対照曲線 (図6 参照) を示す.

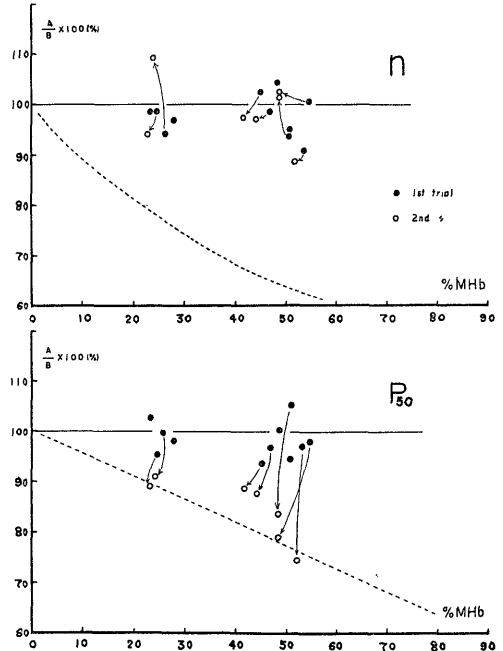
(図中の点線: 図6 参照) と比較すると, n は全般にやや高い値を, P₅₀ はほぼ同値を示した.

実験9: 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合全血の酸素解離曲線

全血を遠心して赤血球と血漿を分離し, 血漿は冷蔵

保存する. 一方, 分離赤血球には過量の NaNO₂ を加え, Hb を完全に酸化した. 前実験と同様の方法にて過剰の NaNO₂ を除去し, これに保存中の血漿を注入して, 完全酸化 Hb 全血を作った. これと正常全血を適当比に混合して, 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合全

図8 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合全血と正常 Hb 全血の n, P₅₀ 値についての百分率



$\frac{A}{B} \times 100(\%)$ の A は完全酸化 Hb-正常 Hb 混合全血の, B は正常 Hb 全血の n, P₅₀ 値を表わす.

.....は対照曲線 (図6 参照) を示す.

●は混合直後, ○は2日後の測定を表わす.

表4 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合全血と正常 Hb 全血の n, P₅₀ 値とその百分率

No.	A) 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合全血				B) 正常 Hb 全血			$\frac{A}{B} \times 100(\%)$	
	Met Hb (%)	n	P ₅₀ (mmHg)	溶血度 (%)	n	P ₅₀ (mmHg)	溶血度 (%)	n	P ₅₀
1	23.5	2.59	31.0	2.0	2.63	30.3	0.5	98.5	102.3
2	27.7	2.74	30.9	1.5	2.84	31.6	0.4	96.5	97.8
3	48.6	2.89	31.1	2.1	2.78	31.1	0.4	104.0	100.0
4	50.3	2.91	30.5	3.0	3.06	32.2	2.0	95.0	94.6
5	24.5	2.61	30.2	1.2	2.65	31.8	1.6	98.5	95.0
5'	22.8	2.54	27.0	1.6	2.70	30.4	2.0	94.0	88.7
6	26.0	2.80	30.0	1.8	3.00	30.2	0.0	93.3	99.3
6'	23.8	3.09	26.1	2.8	2.89	28.9	0.7	108.8	90.3
7	45.0	2.38	30.6	3.0	2.33	32.7	2.5	102.1	93.6
7'	42.0	2.54	27.9	3.6	2.61	31.6	2.8	97.3	88.3
8	46.4	3.30	30.4	1.1	3.37	31.5	0.4	97.9	96.5
8'	43.8	2.76	27.2	1.4	2.84	31.1	0.6	97.2	87.5
9	50.3	2.99	32.5	0.9	3.21	31.0	1.3	93.0	105.0
9'	48.6	3.10	26.5	2.0	3.05	31.6	1.9	101.5	83.8
10	53.1	2.58	32.8	2.1	2.85	33.9	1.2	90.5	96.8
10'	51.6	2.59	23.8	2.3	2.93	32.0	1.2	88.4	74.3
11	54.5	2.90	30.6	0.7	2.91	31.3	0.2	100.0	97.8
11'	48.3	3.03	26.5	0.7	2.96	33.6	0.3	102.3	78.9

No. 1~11 は混合直後の測定, No. 5'~11' は混合後 2 日間冷蔵保存後における測定を表わす。

血を作成し、対照の正常全血とについて酸素解離曲線を描き、P₅₀ と n を算出した。

実験条件として、できるだけ溶血しないように、血液試料を十分に注意して取り扱った。すなわち、血液と接触するすべての容器をシリコネートし、トノメーター平衡時間を10分間に限定して、攪拌振盪による溶血をさけた。試料の pO₂ は電極法 (Beckman の装置) で測定した。また、血液試料の溶血程度を実験前後に測定した。

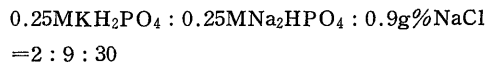
表4のNo. 5~11の7例において、完全酸化 Hb-正常 Hb 混合全血および対照の正常全血ともに、全く同一試料につき、2日の間隔において2回酸素解離曲線の測定を行なった。第1回目の測定は混合直後に、第2回目の測定は2日間冷蔵保存後に行なった。ダッシュつき No. は2回目の測定結果を示す。表4および図8より、混合直後では n および P₅₀ ともに正常全血とほぼ同値 (n: 97.0±4.1, P₅₀: 98.1±3.4) を

示すが、2日後の測定では P₅₀ は明らかに低下 (Met-Hb 量約 25%で 89.1±1.1, 約 50%で 82.6±5.6) し、図中の対照曲線 (図6参照) とほぼ一致した。しかるに一方、n は混合直後の値とほぼ同値 (98.5±6.5) を示すにとどまった。

実験10: 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合赤血球浮遊液の酸素解離曲線

実験9の血漿の代りに、磷酸緩衝液で pH を 7.40 に調製した生理的食塩水を用いて、完全酸化 Hb 赤血球浮遊液および正常赤血球浮遊液を作った。この両者を適当比に混合して、完全酸化 Hb-正常 Hb 混合赤血球浮遊液とし、正常赤血球浮遊液を対照に用いて、酸素解離曲線を描いた。

磷酸緩衝液添加生理的食塩水とは、



の比率で混合したもので、この混合液にも NaF を加

表6 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合赤血球浮遊液と正常 Hb 赤血球浮遊液の n, P₅₀ 値とその百分率 (2)

	No.	A) 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合赤血球浮遊液				B) 正常 Hb 赤血球浮遊液			$\frac{A}{B} \times 100(\%)$	
		Met Hb (%)	n	P ₅₀ (mm Hg)	溶血度 (%)	n	P ₅₀ (mm Hg)	溶血度 (%)	n	P ₅₀
乳	1	49.8	2.91	24.3	0.8	2.85	27.2	0.5	102.1	89.3
	1'	43.0	2.65	23.4	1.7	2.77	26.0	0.9	95.7	90.0
	2	51.0	2.82	24.9	1.1	2.49	27.4	0.6	112.8	90.9
	2'	45.6	2.59	24.3	2.6	2.84	27.8	1.7	91.4	87.4
酸	3	53.0	2.61	23.8	2.2	2.78	27.3	1.3	93.8	87.2
	3'	49.4	2.59	23.1	2.9	2.70	27.0	1.7	95.7	85.5
	4	58.2	2.93	22.0	1.0	3.08	27.2	1.2	95.1	80.9
	4'	55.0	2.85	21.2	1.6	2.70	26.2	1.5	105.6	80.9
アスコルビン酸	5	49.8	2.81	25.7	2.0	2.96	28.1	1.2	94.9	91.5
	5'	40.9	2.41	25.5	3.3	3.04	27.0	1.5	79.3	94.4
	6	50.0	2.66	24.9	1.5	2.88	28.1	1.2	92.4	88.6
	6'	41.0	2.73	26.6	2.9	3.33	30.4	1.8	82.0	87.5
還元グルタチオン	7	54.0	2.64	25.9	2.0	2.78	27.9	1.6	95.0	93.3
	7'	46.5	2.52	26.1	2.8	3.01	28.5	1.9	83.6	91.6
	8	42.7	2.65	26.9	2.2	2.98	29.3	1.0	88.9	91.8
	8'	40.6	3.01	25.7	3.0	3.36	27.7	1.6	89.6	92.8
還元グルタチオン	9	48.2	2.76	25.7	2.9	3.13	27.1	1.2	88.2	95.2
	9'	46.4	2.60	24.6	3.7	2.91	26.9	1.8	89.4	91.4
	10	56.8	2.92	27.0	2.0	3.24	27.8	1.3	90.1	97.1
	10'	50.7	3.05	25.2	3.5	2.79	29.4	1.9	109.3	85.7

No. 1~10 は混合直後の測定, No. 1'~10' は混合後2日間冷蔵保存後の測定を表わす。

えた。pH は 7.38~7.40 である。

この実験に際しても溶血を極力さけ、また、血液の溶血度を実験前後に測定した。

表5および図9より、nおよびP₅₀ともに混合直後 (n: 96.2±4.4, P₅₀: 97.2±4.6), 2日間冷蔵保存後 (n: 98.5±4.9, P₅₀: 96.7±4.7) に拘らず100を中心に分布し、正常赤血球浮遊液とはほぼ同値を示した。

実験11: 完全酸化 Hb-正常 Hb 混合赤血球浮遊液の媒質に、還元物質を加えた場合の酸素解離曲線
実験10の磷酸緩衝液添加生理的食塩水に、乳酸、アスコルビン酸、還元グルタチオンを加えて同様の実験を行なった。

血液中の乳酸、アスコルビン酸、還元グルタチオンの正常値¹⁹⁾は、それぞれ、0.4~1.8 mM/l, 0.4~1.5 mg/100 ml, 26.5~31.9 mg/100 ml である。著者は乳酸 4 mM/l, アスコルビン酸 5 mg/100 ml, 還元グルタチオン 100 mg/100 ml の割合で、前記処方磷酸緩衝液添加生理的食塩水にそれぞれ加えて、3種類の媒質を作り、完全酸化 Hb-正常 Hb 混合赤血球浮遊液の媒質とした。これら3種類の完全酸化 Hb-正常 Hb 混合赤血球浮遊液の酸素解離曲線を描き、nとP₅₀を算出し、表6と図10に表わした。

乳酸添加の場合、混合直後は、n: 101.0±8.7, P₅₀: 87.1±4.4であり、2日後の測定では、n: 97.1±6.0, P₅₀: 86.0±3.0であった。アスコルビン酸添加の場

合直後の測定では、 $n: 94.1 \pm 1.5$, $P_{50}: 91.1 \pm 4.0$, 2日後の測定で、 $n: 81.6 \pm 2.4$, $P_{50}: 91.2 \pm 3.5$ であった。還元グルタチオン添加の場合、混合直後は、 $n: 90.1 \pm 1.0$, $P_{50}: 94.7 \pm 2.7$, 2日後の測定で、 $n: 96.1 \pm 7.9$, $P_{50}: 90.0 \pm 3.8$ であった。

図10より、 P_{50} は何れも混合直後より幾分低下しているのを見ることができる。一方、 n に関しては、アスコルビン酸添加は2日間に著明な減少をもたらしているが、乳酸および還元グルタチオン添加の効果は明白でなかった。

考 察

Met-Hbは正常人赤血球の全Hb量の1%前後を占め、Hbとの間に酸化還元平衡が成立しているものと考えられる⁴⁾。この平衡状態は各種の酸化還元系の影響を受けているが、正常赤血球内では強い還元系の作用によって、平衡は著しく還元方向に傾いている。それ故、正常血液中のMet-Hb量は極くわずかな値を示すに過ぎない。しかし、正常赤血球も一度溶血すると、還元作用を失い酸化方向に平衡が傾き、時間の経過に伴ない、漸次Met-Hbが増加していく²⁰⁾。

Jandelら²¹⁾は何ら試薬を加えることなく、37°Cに保温した正常人赤血球は7日後に約70%のMet-Hbを含んでいたが、溶血赤血球は5日間で完全に酸化されていたと報告している。

Greenberg¹¹⁾やDarlingら¹⁰⁾は全血に NaNO_2 を添加してHbを酸化すると、添加後時間の経過に伴ない一旦酸化したHbが、漸次還元する現象を観察している。また、Jaffé²²⁾は人赤血球において、酸化Hbの方が還元Hbより酸化に対して抵抗性が大であると述べている。

著者は以上の知見に対して、若干の実験的検討を試みた。実験1(図2-a)はHbが赤血球内にある状態、すなわち全血に NaNO_2 を加えて、Hbを部分的に酸化した場合、時間の経過に伴ないMet-Hbが漸次還元していくのを示している。 NaNO_2 添加直後に約60%のMet-Hbを含有していた血液が、5時間後に約40%前後のMet-Hbに減少していた。また、この実験において酸素の有無とMet-Hbの還元速度の間に、明白な関係を認めることができなかった。一方、実験2(図2-b)は部分酸化したHbが溶血により、実験1とは逆にさらに酸化が進行していくことより、還元機序が失われ酸化方向に平衡が移動しているのを示している。実験2と実験3(図3-a)の成績を比較すると、溶血血液におけるHbの酸化の進行に対して、血漿混入の有無は特別の影響を有していないのが分る。実験4(図3-b)は正常全血も一旦溶血すると、一定

の速度で酸化Hbが増加していくことを立証している。すなわち、溶血直後1~2%であったMet-Hbが5時間保温している間に約4倍に増加していた。また、実験5(図3-bの×印)はHbの酸化速度とHb濃度の間に特別の関係がないことを示している。さらに、実験2~4の成績より、溶血血液におけるHbの酸化速度に対する酸素の有無の影響は著明で、無酸素状態の方が酸化の進行が大きいのが分る。

赤血球内におけるHbとMet-Hbの酸化還元機序は単一なものではなく、その充分な解明な未だ得るに至っていない²⁰⁾²²⁾。

著者は爾後の実験の必要上、赤血球内のMet-Hbの自発的還元を阻止する方策を検討した。

Warburg²³⁾は赤血球にブドウ糖を与えるとMet-Hbの還元が起ることを、Gibson²⁴⁾はMet-Hbの還元にはブドウ糖のみならず乳酸も有効であると報告している。一方、Met-Hbの還元阻止に関して、0.002Mモノヨード酢酸の添加はブドウ糖に起因するMet-Hbの還元を阻止したが、0.01M NaFの添加はその還元を阻止しえなかったとの報告がある²⁰⁾²²⁾。

著者は解糖がMet-Hbの還元機序に関与していると考え、Met-Hbの還元阻止の目的をもって、解糖阻止剤の一つであるNaFを用いて、その効果を実験6(図4のaとb)において検した。その結果、血液ml当り1mg(0.024M)濃度のNaF添加では依然としてMet-Hbの還元を認めるが、3mg(0.072M)以上の濃度のNaF添加にてMet-Hbの還元は完全に阻止されるのを見た。

試験管内実験において、Hbに対する NaNO_2 の酸化作用は複雑で、その結果産生されるMet-Hbの量は NaNO_2 の濃度、pH、酸素の有無、還元剤の有無等で変化するという¹⁰⁾。

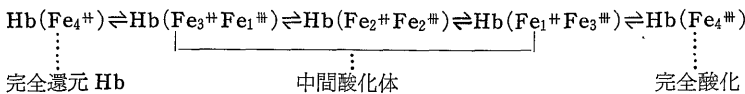
著者は実験7(表2)より、血液(加NaF)に加えた1Mの NaNO_2 より 1.14 ± 0.24 MのMet-Hbが形成されるのを見たが、Greenberg¹¹⁾は1Mの NaNO_2 より2MのMet-Hbが、また、Barcroftら²⁵⁾は2Mの NaNO_2 より1MのMet-Hbが形成されると報告している。Van Slykeら²⁶⁾は1Mの NaNO_2 が1MのHbと反応して1MのMet-Hbを形成するというし、Austinら²⁷⁾はその比が0.5~0.7であると報告している。以上列挙した如く、 NaNO_2 とそれによって形成されるMet-Hbの間の量的関係にはあいまいな点が残されている。

部分酸化Hbの酸素解離曲線についてのDarlingら¹⁰⁾の研究は、Hbの部分酸化により酸素運搬能の低下

のみならず酸素親和性の増加および酸素解離曲線の双曲線化等, Hb の機能面での基本的性質に著明な変化が起ることを指摘している. Hb の部分酸化の程度と, 残された酸化されていない Hb の酸素平衡の量的関係に関しては, 稀薄な Hb 溶液を用いた徳井²⁸⁾の報告がある.

著者は Hb がなるべく自然に近い状態, すなわち赤血球に含まれた状態で, Hb を部分酸化した場合の酸素解離曲線を求め, その形と位置を表わす Hill 式の n と P_{50} を算出した. Hb の部分酸化の程度と, これら parameter (媒介変数) の関係は表 1 および 図 6 に示す通りである. 図 6 の点線の如く Hb の部分酸化の進行とともに, n は曲線的に, P_{50} は直線的に減少していった. 著者および徳井²⁸⁾の実験成績より, Hb が赤血球に含まれた状態, あるいは溶液の状態の如何に拘らず, 部分酸化が進行するに伴ない, n および P_{50} ともに低下していくのが明らかとなった.

Hb の部分酸化に伴なう酸素解離平衡に関する n と P_{50} の低下, すなわち, ヘムヘム相互作用の減弱と酸素親和性の増大は, Adair²⁹⁾ の Hb 酸素化に関する中間体説にならって, 次のように理解されよう. Hb 分子には 4 個の 2 価鉄原子 (Fe^{2+}) があって, それぞれ酸素 1 分子を結合する能力を有する. 一方, Conant³⁰⁾ や Taylor ら³¹⁾ により Hb と Met-Hb とは一つの酸化還元系を形成することが立証されているから, Hb に酸化要因が働く場合, Hb の 4 個の Fe^{2+} は次の式のように順次酸化されて



Fe^{3+} となり, 同時に酸素結合能力を失っていく. したがって, Hb の酸化は 4 段階を経て最終的に完全酸化 Hb に到達するが, 不完全酸化の段階では溶液中には, 3 種の中間酸化体が共存する筈である. そして, この中間酸化体の存在が酸素解離曲線の変形をもたらす原因

と考えられる. すなわち, Hb の 4 個の Fe^{2+} の酸化が進行するにつれて, 残った Fe^{2+} の酸素親和性が増大するとともに, Fe^{2+} の酸素化が他の Fe^{2+} の酸素親和性におよぼす影響, すなわち, ヘムヘム相互作用は小さくなると考えられる.

これに関連して興味あることは, 異常 Hb の 1 種である HbM である. HbM には色々の種類がすでに報告されている¹⁾⁻³⁾が, その特徴はグロビン分子を構成する α 鎖または β 鎖の何れかのアミノ酸構成に 1 個所異常があつて, これに接続するヘム鉄が Fe^{2+} となっている. すなわち, Hb 分子中 4 個のヘム鉄の中, 2 個が Fe^{2+} , 2 個が Fe^{3+} となり, Met-Hb のような褐色を呈するものである. ところが HbM の酸素平衡は, 正常 Hb を酸化剤で部分的に酸化したものの酸素平衡とは異なり, 表 7 に示すように α 鎖に異常のある HbM では, n はほぼ 1 に近く, P_{50} は正常 Hb より大きい. 一方, β 鎖に異常のある場合にはまた異なった酸素平衡を呈する. 故に, Hb の酸素平衡は単にヘム鉄の状態ばかりでなく, グロビンの分子構造によって強く影響されることを了解しなければならぬ.

従来報告されている Met-Hb 血の酸素解離曲線については, 諸家の見解は必ずしも一致しない. Darling ら¹⁰⁾は $NaNO_2$ を投与したイヌについて, Met-Hb 血の発生に伴ない血液の酸素解離曲線は, 試験管内で作成された Met-Hb の実験所見と同様の変化を生ずるという. 然るに, 先天性 Met-Hb 血症患者の血液の酸素解離曲線については, Eder⁵⁾は約 40% Met-Hb を有する先天性 Met-Hb 血症患者 1 例について, また, Waisman⁶⁾は 24% Met-Hb を有する先天性 Met-Hb 血症患者 1 例について, いずれも正常血液の酸素解離曲線と全く変りない酸素解離曲線を得ている. この 2 報告のいずれの家族にも患者以外の Met-Hb 血症患者は存在せず, 遺伝関係についての特別の

表 7 各種 Hb M および先天性 Met-Hb 血症の比較

		n	P_{50}	Bohr 効果	遺伝関係
異常ヘモグロビン	Hb Mosaka	1.2~1.3	大	ほとんどなし	あり
	Hb Miwate	ほぼ 1.0	大	ほとんどなし	あり
	Hb Mkurume	ほぼ 1.0	ほぼ正常	やや 大	あり
先天性メトヘモグロビン血症	Eder et al	正 常	正 常	—	不 明
	Waisman et al	正 常	正 常	—	不 明
	Gibson et al	小	小	—	不 明
	Baikie et al	—	小	—	あ り

記載はない。一方、Gibson ら⁷⁾は1家族9人兄弟中5人に特発性 Met-Hb 血症患者を(ただし両親は異常なし)、また、Baikie ら⁸⁾は親子2世代にわたり4人の遺伝性 Met-Hb 血症患者を見出しているが、これらの患者の血液の酸素解離曲線は正常血液のものと異なり、いずれも酸素親和性は増大していた。Gibson らの症例ではその酸素解離曲線は直角双曲線化されていたとされているが、Baikie らの症例ではその点に関する記載はなされていない。

このような実験所見の不一致は Met-Hb の成因の相違によるものかもしれない。しかし、上掲の Eder らおよび Waisman らの報告のように、Met-Hb 血があるにも拘らず正常な酸素解離曲線が得られるという実験所見は、これらの症例においては血液中に部分酸化された Hb、すなわち中間酸化体は存在せず、血液中の Hb は一部分は完全に酸化された全く不活性の Met-Hb であり、残りの Hb は正常の Hb であって両者が1つの血液中に共存し、そして正常な酸素解離曲線は後者により顕現されることを推論せしめるものである。

このような完全酸化 Hb と完全還元 Hb の2者のみが1つの血液中に果たして共存しうるものであろうか。著者はこの問題について実験的検討を試みた。

実験8(表3, 図7)では完全酸化 Hb と正常 Hb を有する2種の赤血球浮遊液を作り、これらを溶血して混合し、直ちにその酸素解離曲線を測定した。その P_{50} と n を算出し図6の対照曲線と一緒に描いたものが図7である。ここに明らかな通り P_{50} は対照曲線と一致し、 n は対照曲線に近接しているが、いくらか高い値を示した。この所見より完全酸化 Hb と正常 Hb が1つの溶液に混合される時は、相互間に酸化還元反応が速やかに進行して、中間酸化体が形成されるものと考えられる。したがって、1つの赤血球内に完全酸化 Hb と正常 Hb の2者のみが共存しうるとは考えられない。

次に、完全酸化 Hb と正常 Hb とがそれぞれ別個の赤血球に含まれている血液では、相互間に介在する血漿を通して両種の Hb の間に、酸化還元反応が起りうるかどうかか問題になる。もしこの反応が起らなければ、Met-Hb 血が正常の酸素解離曲線を示すということもあり得る訳である。これを検証するために実験9(表4, 図8)を行なった。この実験は血液の赤血球の1部を取り出し、その Hb を完全酸化 Hb にして元の血液に戻し、その直後と2日後に酸素解離曲線を測定した。直後に測定した酸素解離曲線より算出された P_{50} と n は、ほぼ正常 Hb 血の酸素解離曲線のそれ

と一致した。この事実より、それぞれの赤血球内に閉じこめられた完全酸化 Hb と正常 Hb との間には、短時間の接触では認めうる程の酸化還元反応は進行せず、したがって中間酸化体もできていないと考えられる。しかし2日後においては、その酸素解離曲線の P_{50} は著しく低下しほぼ対照曲線に一致しているが、 n の値には著変が認められない。この所見と図8の所見を合わせて考えると、 P_{50} の低下(Hbの酸素親和性の増大)と n の低下(ヘムヘム相互作用の低下)は必ずしも同時に平行して発現しなことから、この2つの変化は別個の機転で起るものと推測される。2日後に見られた P_{50} の低下は明らかに Hb 分子に何らかの変化が生じた結果であり、対照曲線と良く一致している点より、別々の赤血球に含まれている完全酸化 Hb と正常 Hb の間に酸化還元反応が行なわれたため生ずる、Hb の中間酸化体の産生の結果と考えられる。これに反し、 n は Hb の中間酸化体の産生の方法その他不明の条件により、その値が変化するものではないかと考えられる。この実験では試料は2日間冷蔵保存されたものであって、生理的条件とは著しくかけ離れている。したがって、この所見をそのまま生体に当てはめて論ずることはできないが、個々の赤血球内容の間に酸化還元反応が成立することを強く暗示するものである。

以上の事象から、赤血球間に介在する血漿に、赤血球相互間の酸化還元を媒介する物質の存在が推定される。そこで、これを除去する実験、すなわち実験9における試料の血漿を生理的食塩水で置換して、同様に P_{50} と n を測定する実験10(表5, 図9)を行なった。この実験においては図9の如く、両種赤血球の混合直後はもとより2日後においても、その酸素解離曲線の P_{50} と n はほぼ正常 Hb の値に止っている。換言すれば、ある赤血球に含まれている正常 Hb と他の赤血球に含まれている完全酸化 Hb の間には相互作用はなく、したがって中間酸化体も産生されなかったと考えられる。それ故に、正常の血漿中には赤血球間の酸化還元反応を媒介する物質が含まれているものと推定される。

血漿中の仲介還元物質として、ブドウ糖、乳酸、アスコルビン酸および還元グルタチオン等の存在が一般に考えられている²⁾が、ブドウ糖についてはすでに記した如くである。著者は実験11(表6, 図10)において、乳酸、アスコルビン酸および還元グルタチオンを血中正常値の約2倍量を生理的食塩水に添加して、実験10と同様の測定を行ない、個々の赤血球に含まれる完全酸化 Hb と正常 Hb の相互間における酸化還元反応に、これらの物質が如何なる影響をおよぼすかを検索した。図10より P_{50} はいずれも混合直後よりいくらか

低下していることから、ある程度の酸化還元を仲介したものと推測される。しかし、混合後の時間の経過に伴う特別な効果は認められなかった。一方、 n に関してはアスコルビン酸添加は2日間に著明な減少をもたらしているが、乳酸および還元グルタチオンの特別な効果は認められなかった。この実験成績より、これらの物質は赤血球間の酸化還元を仲介にいくらか役立っているものと推量される。

最後に、以上の諸実験の成績より、Gibson ら⁷⁾および Baikie ら⁸⁾の報告した先天性 Met-Hb 血症の血液の酸素解離曲線が正常血液と異なることは充分理解しうるが、Eder ら⁵⁾および Waisman ら⁶⁾の報告した先天性 Met-Hb 血症の酸素解離曲線が正常血液と全く一致した点については、少なくとも著者の行なった試験管内実験からは説明しがたい。これらの Met-Hb 血が存在するためには、赤血球の自発性 Met-Hb 還元能の欠如と、血漿中に介在する酸化還元反応物質の欠如とが同時に成立せねばならない。あるいは Hb 自体の異常に基づくものかも知れない。

総括および結論

NaNO₂ でウシ Hb を赤血球に含まれた状態、あるいは溶液の状態で、部分的に、あるいは完全に酸化し、その酸化還元反応、Met-Hb の還元阻止方法および Met-Hb 血の酸素平衡等について検索した。

1. 正常全血の Hb を NaNO₂ で部分的に酸化すると、NaNO₂ 添加後、時間の経過に伴ない一旦酸化した Hb が漸次還元していった。酸素の有無は酸化 Hb の還元速度に対して明白な影響をおよぼさなかった。

2. 1 を溶血した場合、1 とは逆に NaNO₂ 添加後、時間の経過に伴ない酸化がさらに進行していった。この際、血漿混入の有無、Hb の濃度は溶血血液の Hb の酸化への進行に対し特別の影響を有していなかった。一方、酸素の有無による Hb の酸化程度の差は著明で、無酸素状態の方が酸化 Hb の進行が大であった。

3. 全血における酸化 Hb の還元を阻止するため、NaF を還元阻止剤として用い、血液 1 ml 当り 3 mg の NaF (0.072 M NaF) の添加で、その目的をはたすことができた。

4. NaNO₂ で全血の Hb を酸化する場合、1 M の NaNO₂ より 1.14±0.24 M の Met-Hb が形成された。

5. Hb が赤血球内にある状態、すなわち全血の状態では Hb 分子を部分的に酸化した場合の酸素平衡について、Hill 式の n と P₅₀ を指標として検した。その結果、Hb の部分酸化の増加に伴ない、 n は曲線的

に、P₅₀ は直線的に漸減した。

6. 完全酸化 Hb と正常 Hb を溶液の状態では混合した場合、酸化 Hb の増加に伴ない、 n および P₅₀ は共に漸減した。これを 5 の対照曲線と比較すると、P₅₀ は略一致しているが、 n はやや高い値を示している。

7. 完全酸化 Hb と正常 Hb を全血の状態では混合した場合、短時間の接触では認めうる程の酸化還元反応は進行していなかったが、2日後において P₅₀ は著るしく低下していた。しかし、 n について著変は認められなかった。

8. 7 における試料の血漿を生理的食塩水で置換して、P₅₀ と n を測定した。両種赤血球の混合直後および 2 日後において、P₅₀ と n は共に、ほぼ正常 Hb の値と一致した。7 と考え合わせると、正常血漿中には個々の赤血球内容間の酸化還元を仲介する物質が存在するものを考えられる。

9. 8 の生理的食塩水に乳酸、アスコルビン酸および還元グルタチオンをそれぞれ血中正常値の約 2 倍量添加して、同様の方法にて P₅₀ と n を測定した。いずれの場合も、P₅₀ は混合直後よりいく分低下していた。 n に関してはアスコルビン酸添加は 2 日間に著明な変化をもたらしていたが、乳酸および還元グルタチオンの特別な効果は認められなかった。

10. Hb の酸化還元に伴ない酸素平衡に関する、ヘムヘム相互作用と酸素親和性の変化は必ずしも平行しなかった。

11. 先天性 Met-Hb 血症の示す酸素解離曲線について考察した。

稿を終るに臨み、終始御懇篤なる御指導、御鞭撻を戴きかつ御校閲を賜りました恩師齋藤幸一郎教授に深く謝意を表します。さらに有益なる御助言と御協力を戴いた本田助教授、高野講師および第一生理学教室員諸兄に感謝致します。

文 献

- 1) Suzuki, T., Hayashi, A., Yamamura, Y., Enoki, Y. & Tyuma, I. : Biochem. Biophys. Res. Commun., 19, 691 (1965).
- 2) Kikuchi, G., Hayashi, N. & Tamura, A. : Biochem. Biophys. Acta., 90, 199 (1964).
- 3) 林 昭・清水 章・鈴木友和・山村雅一 : 医化学シンポジウム第 5 集, 23 頁 (1961).
- 4) Bodansky, O. : Pharmacol. Rev., 3, 144 (1951).
- 5) Eder, H. A., Finch, C. & Mckee, R. W. : J. Clin. Invest., 28, 265 (1949).
- 6) Waisman, H. A., Bain, J. A., Richmond, J. B. & Munsey, F. A. :

- Pediatrics., 10, 293 (1952). 7) **Gibson, Q. H. & Harrison, D. C.** : Lancet., II, 941 (1947). 8) **Baikie, A. & Valtis, D.** : Brit. Med. J., 2, 73 (1954). 9) **Hill, A. V.** : J. Physiol., 40, 4 (1910).
- 10) **Darling, R. C. & Roughton, F. J. W.** : Amer. J. Physiol., 137, 56 (1942). 11) **Greenberg, L. A., Lester, D. & Haggard, H. W.** : J. Biol. Chem., 151, 665 (1943).
- 12) **Brooks, J.** : Proc. Roy. Soc., London. Series B., 118, 560 (1935). 18) **Evelyn, K. A. & Malloy, H. T.** : J. Biol. Chem., 126, 655 (1938). 14) **Henry, R. J.** : Clinical Chemistry P. 753; A Hoeber-Harper International Reprint. 1966. 15) **西田玲子** : 日生理誌, 30, 725 (1968). 16) **斎藤幸一郎** : 血液化学 (黒田嘉一郎ら編), 56頁, 東京, 朝倉書店, 1963. 17) **Bohr, C., Hasselbalch, K. & Krogh, A.** : Skand. Arch. Physiol., 16, 402 (1904). 18) **宮下敏** : 十全医会誌, 第78巻, 第2号 (1969). 19) **Handbook of Respiration (1958)** : W. B. Saunders Comp. 20) **中尾 真** : 血液化学 (黒田嘉一郎ら編) 153頁, 東京, 朝倉書店, 1963.
- 21) **Janael, J. H., Engle, L. K. & Allen, D. H.** : J. Clin. Invest., 39, 1818 (1960). 22) **Jaffé, E. R.** : The Red Blood Cell p. 396 by Bishop, C. & Surgenor, D. M. Academic Press. New York and London, 1964. 23) **Warburg, O., Kubowitz, F. & Christian, W.** : Biochem. Zschr., 227, 243 (1930). 24) **Gibson, Q. H.** : Biochem. J., 42, 13 (1948). 25) **Barcroft, J. & Müller, F.** : J. Physiol., 43, 20 (1911). 26) **Van Slyke, D. D. & Vollmund, E.** : J. Biol. Chem., 66, 415 (1925). 27) **Austin, J. H. & Drabkin, D. L.** : J. Biol. Chem., 112, 67 (1935). 28) **徳井 宏** : 日生理誌, 28, 629 (1966). 29) **Adair, G. S.** : J. Biol. Chem., 63, 529 (1925). 30) **Conant, J. B. & Pappenheimer, A. M. Jr.** : J. Biol. Chem., 98, 57 (1932). 31) **Taylor, J. F. & Hastings, A. B.** : J. Biol. Chem., 131, 649 (1939).

Abstract

Bovine hemoglobin was partially or completely oxidized to methemoglobin by adding sodium nitrite to whole blood or to laked blood.

Using the methemoglobin solution thus obtained, oxydation-reduction reaction in the relationship to reduced hemoglobin, the inhibitory effect of sodium fluoride on reducing methemoglobin, and oxygen equilibria were studied.

The results obtained were as follows ;

1) Methemoglobin produced by adding nitrite was gradually reduced in the whole blood, but further oxidized in the laked blood in course of time.

2) Oxyhemoglobin was more resistant to oxydation than reduced hemoglobin in the laked blood, but this was not always the case with the whole blood.

3) Hemoglobin concentration showed no influence on the rate of methemoglobin formation in the laked blood.

4) The reduction of methemoglobin to hemoglobin in the whole blood was completely inhibited by sodium fluoride amounting 3 mg per ml blood.

5) One mol nitrite was found to form 1.14 ± 0.24 M methemoglobin in the whole blood.

6) Studies on oxygen equilibria of partially oxidized hemoglobin in the whole blood showed that increasing the degree of oxydation resulted in an elevation of oxygen affinity and decreasing heme-heme interaction when evaluated at constant pH 7.4.

7) Normal and completely oxidized hemoglobin solutions were quickly mixed. The oxygen equilibria of this mixture also exhibited an elevation of oxygen affinity and decreasing heme-heme interaction as the degree of oxydation increased.

8) Mixtures prepared by quickly mixing normal and completely oxidized hemog-

lobin of the whole blood showed a normal feature of the oxygen dissociation curve. However, it gradually altered as time elapsed, i. e. oxygen affinity increased though heme-heme interaction remained normal.

9) On the other hand, in the mixtures from normal and completely oxidized hemoglobin, which are contained in erythrocytes suspended in the saline, the oxygen dissociation curve remained normal with the lapse of time.

10) Effect of lactic acid, ascorbic acid and reduced glutathione on oxydation-reduction reaction was studied in the erythrocyte suspension described in the preceding item. All the chemicals studied showed a certain degree of increasing oxygen affinity, and heme-heme interaction was remarkably decreased by ascorbic acid alone.

11) In the study of oxygen equilibria of the methemoglobin-containing blood, a parallel was not always seen in changes between heme-heme interaction and oxygen affinity.
