

# 亜硝酸イオンによる正常およびアカタラセミアマウス 溶血液中のメトヘモグロビン生成とそれに対する トコフェロール類およびアスコルビン酸の 抑制作用について

岡山大学医学部公衆衛生学教室（指導：緒方正名教授）

井 奥 尚 也

（昭和62年2月14日受稿）

**Key words :** 亜硝酸イオン, カタラーゼ  
メトヘモグロビン, トコフェロール  
アスコルビン酸

## 緒 言

我が国の大気汚染で工場の固定発生源による硫黄酸化物 (SO<sub>x</sub>), 窒素酸化物 (NO<sub>x</sub>) に対して, 近年は移動発生源による NO<sub>x</sub> の大気汚染が深刻化している。

Shy ら<sup>1,2)</sup>によりニトロトルエン工場近辺において急性呼吸器疾患罹患率の高いことが指摘されている。一方, 二酸化窒素 (NO<sub>2</sub>) による血液の変化としてメトヘモグロビン血症がある。NO<sub>2</sub> は水に溶解すると, 硝酸と亜硝酸となる ( $2\text{NO}_2 + \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{HNO}_3 + \text{HNO}_2$ )。亜硝酸塩は単離した赤血球に対してメトヘモグロビン形成作用をもつが, この際 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の発生を伴う<sup>3)</sup>。発生した微量の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> によってメトヘモグロビン化が起こるかどうかはまだ充分にわかっていない。しかし, 自酸化によるメトヘモグロビンの増加に関しては, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> が関係している<sup>4)</sup>。そして, 著者は前報<sup>5)</sup>においてアカタラセミアおよび正常マウス溶血液について, 亜硝酸ソーダを添加した場合のヘモグロビンからメトヘモグロビンの生成が前者において高いことによりカタラーゼがメトヘモグロビン生成に抑制的にはたらくことを認めた。また, 渡辺, 緒方<sup>6)</sup> は人ヘモグロビンの

*in vitro* における  $\alpha$ -トコフェロールによるメトヘモグロビン生成の抑制と, ネズミの *in vivo* におけるビタミン E 投与群に亜硝酸によるメトヘモグロビン生成の抑制が認められたことを報告した。

本報では, *in vitro* において, 正常およびアカタラセミアマウスから得た溶血液に, トコフェロール類およびアスコルビン酸を添加し, これに亜硝酸ソーダ水溶液を反応させた場合, メトヘモグロビンの生成が抑制されること, また, それらの種類と添加量により抑制効果に差異のあることを認めた。そして, トコフェロールの種類による亜硝酸ソーダ添加時のヘモグロビンよりメトヘモグロビン生成の抑制効果と, 亜硝酸ソーダ添加時のヨウ化カリ水溶液よりヨウ素が生成されることに対する抗酸化能とを比較検討したので報告する。

## 実験材料および実験方法

実験材料: 雄の正常マウス (C<sub>3</sub>H/AnL C<sub>3</sub>C<sub>3</sub>) およびアカタラセミアマウス (C<sub>3</sub>H/AnL C<sub>3</sub>C<sub>3</sub>) [4~6週齢, 体重25~33g] 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。

トコフェロール類(以後 Toc. と略す)は, d 体

の  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  および dl 体の  $\alpha$ -Toc. の 5 種 (すべて [株] エーザイ製) で, 活性剤 (Tween-80) と蒸留水にて乳化, 希釈して用いた. また, 1-アスコルビン酸 (以後 AsA. と略す, [株] 和光純薬工業製) で, 蒸留水で溶解し, 希釈して用いた.

#### 実験方法

##### 1. 溶血液の作製

両種マウスより約 1 ml ずつ数匹採血し, 5 倍量の生理食塩水で 5 回洗浄して赤血球を得た. この赤血球を約 10 倍量の蒸留水で溶血した後, 10,000 rpm で 60 分間遠心分離してゴーストを除去して得た溶血液の総ヘモグロビン量, メトヘモグロビン量, カタラーゼ活性度を後述の方法で測定した. そして, 両種マウス溶血液は 1/10 M pH 7.0 リン酸緩衝液を用いて, 0.4 mg Hb/ml に調整し実験に用いた.

##### 2. カタラーゼ活性度の測定

Feinstein の過ホウ素酸法<sup>7)</sup>により 20°C で, 両種マウスの溶血液のカタラーゼ活性度を定量した. 活性度は過ホウ素酸塩-単位 (Perborate Unit) で表した.

##### 3. 総ヘモグロビンおよびメトヘモグロビン量の測定

Van kampen<sup>8)</sup> の試薬を用いた方法で測定した. 分光光度計, 記録計は日立製 (100-60 型, 056 型) を使用した.

##### 4. 亜硝酸ソーダ添加時のヘモグロビンよりメトヘモグロビン生成と Toc. 類と AsA. による抑制作用の測定

0.4 mg Hb/ml に調整された溶血液を 1 cm ガラスセルに 3 ml 採り, 分光光度計にセットし, 試料側の溶血液に亜硝酸ソーダ水溶液 (200 mM, 40  $\mu$ l) 添加し, すばやく攪拌して反応を開始する. この時の, メトヘモグロビン生成の増加を, 37°C, 630 nm における吸光度により経時的に記録した. この時 Toc. 類や AsA. を添加してないものをコントロールとし, Toc. 類を終濃度で 50  $\mu$ g/ml ~ 200  $\mu$ g/ml 添加したもの, AsA. を 25 ng/ml ~ 200 ng/ml 添加したものと比較し, それぞれメトヘモグロビン生成の抑制効果を検討した. この測定を行う時, 分光光度計の試料側, 対照側ともに, 同濃度の薬剤を添加した溶血液

をセットした. これは Toc. 類では乳化したものを使用しているので分光光度計の目盛を 0 にする為で, メトヘモグロビンの増加だけを記録する為行った操作である.

##### 5. 亜硝酸ソーダ添加時のヨウ化カリの酸化によるヨウ素の生成と Toc. 類と AsA. による抗酸化作用の測定.

1/10 M pH 6.8 リン酸緩衝液を用いて 10% ヨウ化カリ水溶液を調整する (以後 KI 液と略す). これに 1% 可溶性でん粉水溶液を添加 (80  $\mu$ l/7 ml) し, 1 cm ガラスセルに 3 ml ずつとり, 分光光度計にセットし, 試料側に, 亜硝酸ソーダ水溶液 (5 M, 200  $\mu$ l) を加え, すばやく攪拌し反応開始とする. この時酸化され遊離されたヨウ素がでん粉と反応し発色した紫色の吸光度を 25°C で, 563 nm において経時的に記録した. この時, Toc. 類や AsA. を添加しないものをコントロールとし, Toc. 類, AsA. を終濃度で 25  $\mu$ M ~ 200  $\mu$ M を添加したものと比較し, それぞれの抗酸化能を検討した.

#### 実験結果

##### 1. 亜硝酸ソーダによる正常およびアカタラセミアマウス溶血液のヘモグロビンよりメトヘモグロビン生成と Toc. 類および AsA. の抑制作用

1-1 両種マウス溶血液のカタラーゼ活性度: 今回使用した正常およびアカタラセミアマウス溶血液のカタラーゼ量は, 正常マウスが 900  $\pm$  88 PU/gHb でアカタラセミアマウス 100  $\pm$  17 PU/gHb の約 9 倍であった.

1-2 Toc. 類と AsA. 添加時の亜硝酸ソーダによるヘモグロビンよりメトヘモグロビンの経時的生成曲線とその解析: ①メトヘモグロビン生成曲線. [図 1. A~F-1, 2] は, 横軸に時間 (分) を, 縦軸には 37°C における 630 nm の吸光度即ち, 亜硝酸ソーダにより生成するメトヘモグロビン量を表している.

亜硝酸イオンによるヘモグロビンのメトヘモグロビン生成曲線は, [図 1, A~F-1: 正常マウス溶血液, 図 1, A~F-2: アカタラセミアマウス溶血液] のコントロール曲線において, 前報<sup>5)</sup>のごとく初期段階では生成速度が遅く, そ

の後急速に反応し、ゆるやかに反応を終るいわゆる Sigmoidal curve となる。そして、5種の Toc. 類は終濃度で、50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$  となる様に、また AsA. では同様に、25, 50, 100, 200  $\text{ng}/\text{ml}$  となる様に添加してメトヘモグロビン生成を抑制するのを記録した。本図で、Toc. 類および AsA. はそれぞれ差はあるものの、その添加量が増加すると抑制効果も増大し、メトヘモ

グロビン生成に要する時間は延長している。Toc. 類や AsA. を添加した場合もメトヘモグロビン生成曲線はほぼ Sigmoidal curve に近い曲線を示した。しかし、Toc. 類では、その添加量が増加するにしたがって、Sigmoidal curve の後半の傾斜がゆるやかになり、メトヘモグロビン生成速度、生成量とも減少してくる。そして、d- $\alpha$ -Toc. や dl- $\alpha$ -Toc. では Sigmoidal curve を

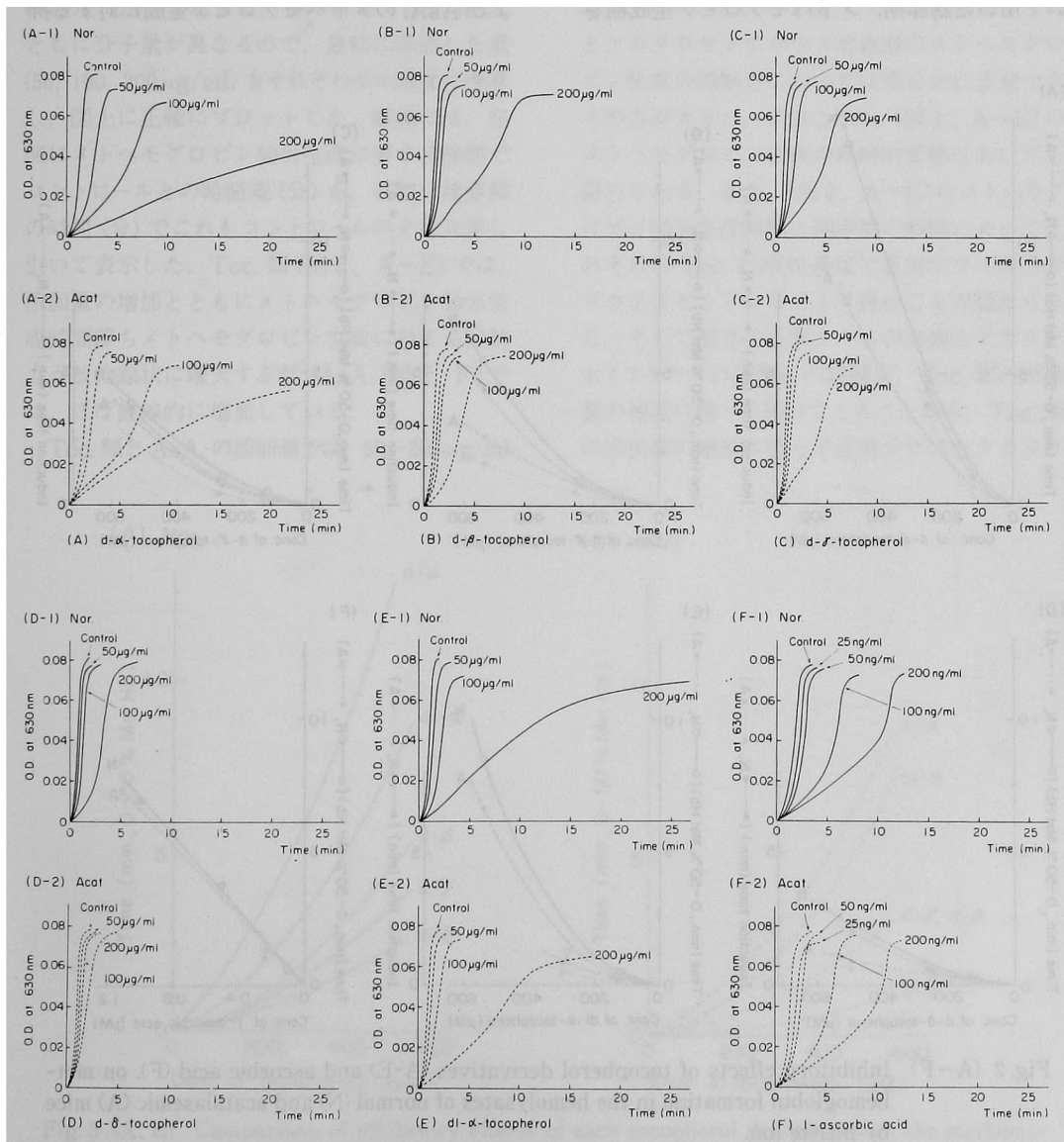


Fig. 1 (A~F 1, 2) Inhibitory effects of tocopherol derivatives (A-E) and ascorbic acid (F), on methemoglobin formation by nitrite ion from the hemoglobin in the hemolysates of normal (1 : Nor) and acatalasemic (2 : Acat) mice.

示さなくなった。これに対し AsA. では、その添加量が増加しても Sigmoidal curve の後半の立ち上がりの傾斜はコントロールのものとあまり変らなかった。

②Toc. 類および AsA. のメトヘモグロビン生成に対する抑制のパラメーター：Toc. 類では前述したが、d- $\alpha$ 、dl- $\alpha$ -Toc. においてその添加濃度が多い場合メトヘモグロビン生成曲線は Sigmoidal curve を示さず、筆者が前報<sup>5)</sup>において用いた誘導期、メトヘモグロビン生成期を

持たない曲線となっている。この為本実験では、Betke ら<sup>9)</sup>が亜硝酸ソーダでオキシヘモグロビンからメトヘモグロビン生成するにあたり、その半分がメトヘモグロビンになるのに要する時間を測定しているが、今回はこの方法を用いた。つまり、それぞれのメトヘモグロビン生成曲線において、メトヘモグロビンの50%生成までの時間を計測し、コントロールのそれを差し引いたメトヘモグロビン50%生成の時間差を Toc. および AsA. のメトヘモグロビン生成に対する抑

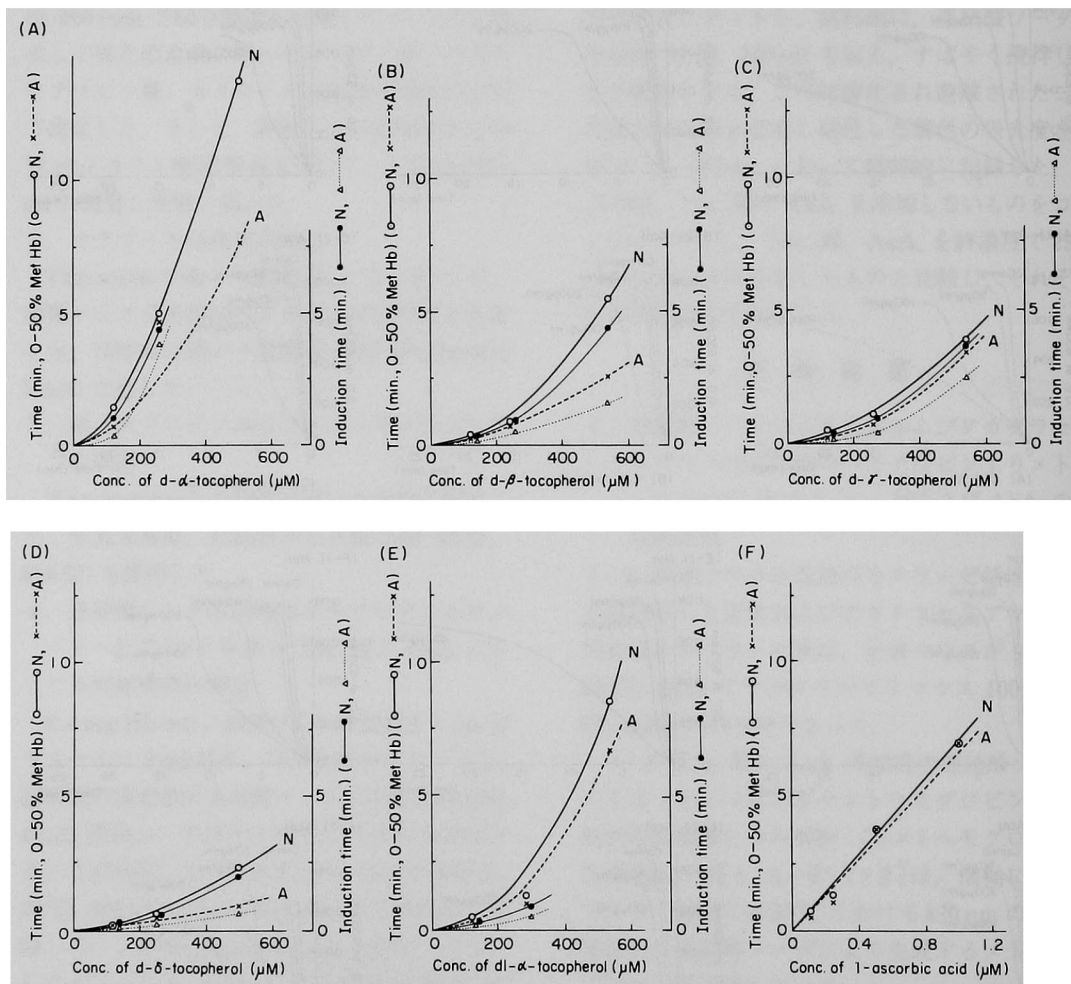


Fig. 2 (A~F) Inhibitory effects of tocopherol derivatives (A-E) and ascorbic acid (F), on methemoglobin formation in the hemolysates of normal (N) and acatalasemic (A) mice by nitrite ion.

(Relation between the concentration of Toc. derivatives or AsA. and the time spending till 50% methemoglobin formation, and between the concentration and the induction time of methemoglobin formation)

制力のパラメーターとした。また、Sigmoidal curveの前半のメトヘモグロビン生成が急激に増加するまでの時間、すなわち誘導期を、測定できるものについて計測し、[図2, A~E]に付随的に示した。

1-3 両種マウス溶血液における Toc. 類, AsA. の添加量の差とヘモグロビンよりメトヘモグロビン生成に対する抑制制度との関係: [図2, A~F] では、横軸に Toc. 類, AsA. とともに添加終濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を示した。この時各 Toc., AsA. とともに分子量が異なるので、最初に添加した量 (50, 100, 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) をそれぞれモル濃度に換算し、図上に正確にプロットした。縦軸には、左側にメトヘモグロビン50%生成に要する時間でコントロールとの時間差(分)を、右側に誘導期の時間(分)でこれもコントロールのそれを差し引いて表示した。Toc. 類 [図2, A~E] では、添加量の増加とともにメトヘモグロビン50%生成時間即ちメトヘモグロビン生成に対する抑制力が放物線状に増大するが、AsA. [図2, F] では、ほぼ直線的に増加している。

Toc. 類と AsA. の添加量では、50~200  $\mu\text{g}/\text{ml}$

に対し25~200  $\text{ng}/\text{ml}$  で約1000倍、モル濃度でも約500倍となっており、Toc. 類と比較して AsA. は非常に少量の添加量で効果を示している。しかし、AsA. は水溶性であるのに対して Toc. 類は脂溶性で、乳化して用いたことも考慮する必要があると考える。

1-4 Toc. 類, AsA. のヘモグロビンよりメトヘモグロビン生成に対する抑制作用における正常マウスとアカタラセミアマウスの差異: ①Toc. 類: 5種のいずれの Toc. においても正常マウスとアカタラセミアマウス溶血液のメトヘモグロビン生成の抑制力については明らかに正常マウスの方が大きい。このことは、[図1, A~E]のメトヘモグロビン生成の経時的変動においても認められる。また、[図2, A~E]のメトヘモグロビン50%生成時間と誘導期の時間においてそれぞれの Toc. の添加濃度で正常マウスの方がアカタラセミアマウスより長いことが認められた。そして図2で正常マウスの実線とアカタラセミアマウスの破線との間隔が、Toc. 類の添加量の増加に伴って開いてくることから、Toc. 類の添加量の増加に伴って正常マウスとアカタラ

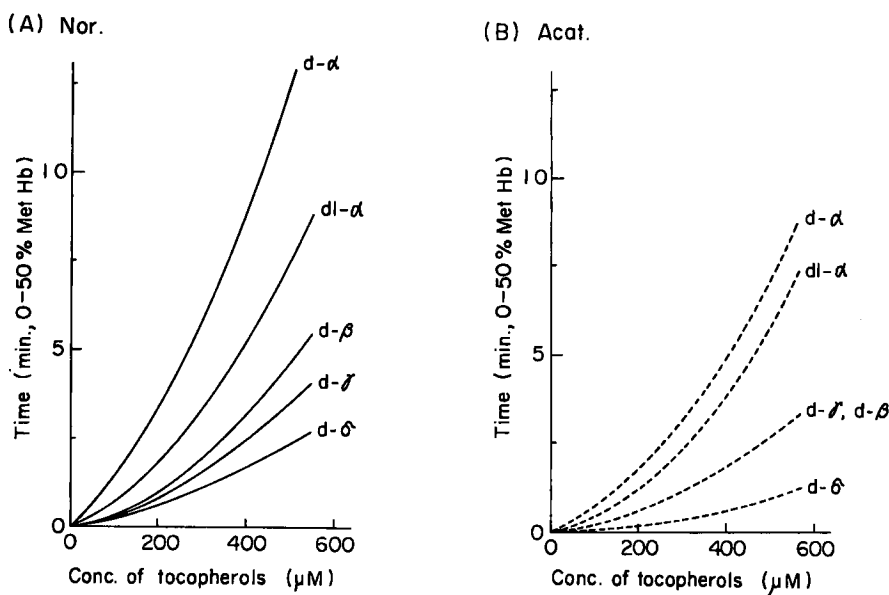


Fig. 3 (A, B) Comparison of inhibitory effects of each tocopherol derivatives on the methemoglobin formation induced by nitrite ion.  
(A) hemolysate of normal mice  
(B) hemolysate of acatalasemic mice

セミマウスのメトヘモグロビン生成の抑制の差が大きくなることを認める。

② AsA. [図 2, F] より, 低濃度で正常マウスがアカタラセミアマウスに比べて, わずかにメトヘモグロビン生成の抑制が強かったが, 全体的にはあまり大きな差は認めなかった。

1-5 Toc. 類の種類によるメトヘモグロビン生成の抑制力の差について: [図 2, A~E] より正常マウス溶血液とアカタラセミアマウス溶血

液とに分けて各 Toc. のメトヘモグロビン50%生成時間の曲線を取り出し作図したものを [図 3, A: 正常マウス], [図 3, B: アカタラセミアマウス] に示した. 正常マウス溶血液における Toc. 類のメトヘモグロビン生成に対する抑制力は,  $d-\alpha > dl-\alpha > d-\beta > d-\gamma > d-\delta$ -Toc. の順であった. 又, アカタラセミアマウス溶血液においては,  $d-\alpha > dl-\alpha > d-\beta = d-\gamma > d-\delta$ -Toc. で両種マウスとも同様の順序を示した。

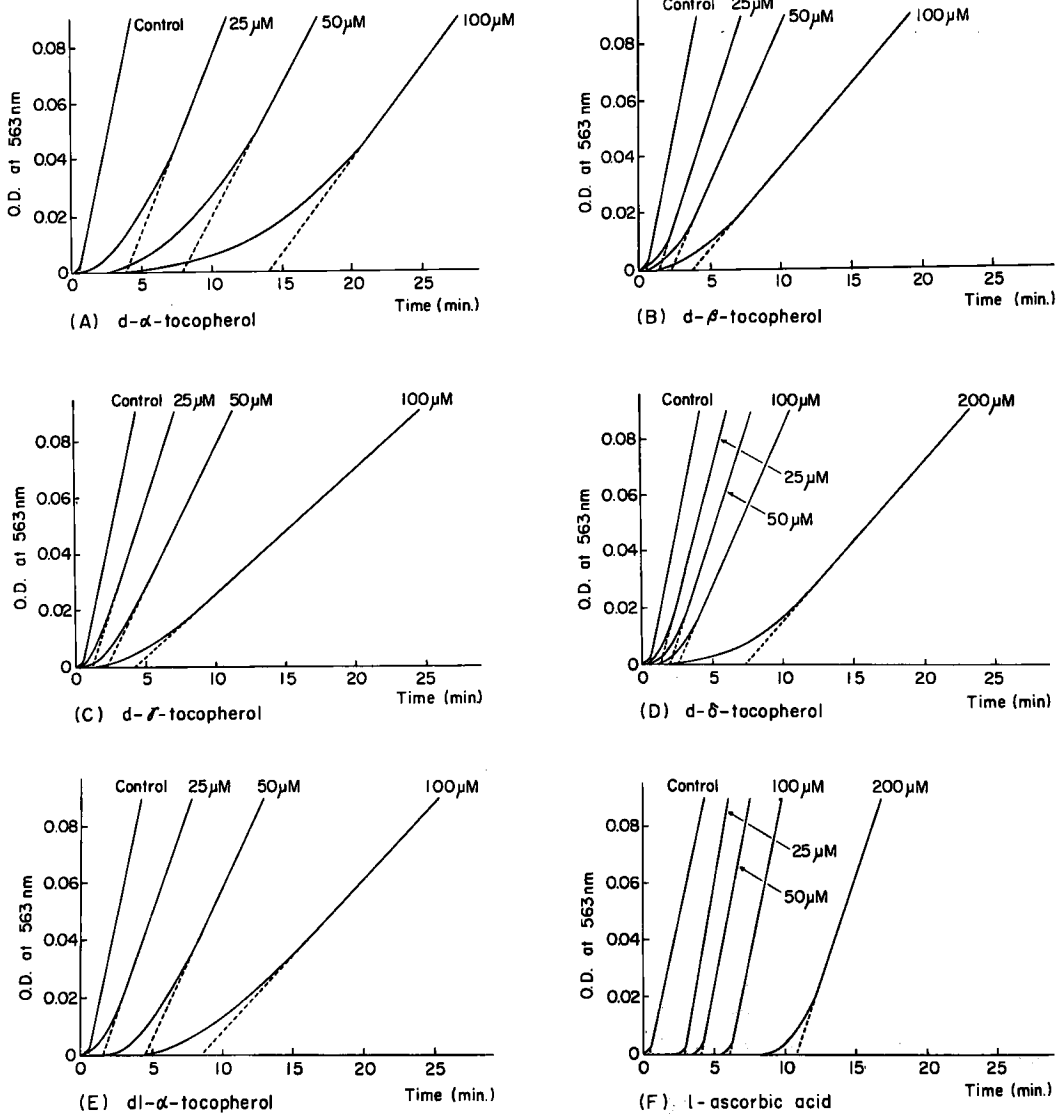


Fig. 4 (A~F) Inhibitory effects of tocopherol derivatives (A~E) and ascorbic acid (F) on the KI oxidation by nitrite ion.

2. 亜硝酸ソーダによるヨウ化カリの酸化と Toc. 類および AsA. の抗酸化能：メトヘモグロビン生成の抑制において Toc. 類の抑制力の差はその抗酸化能によるものかどうかについて亜硝酸による KI の酸化をモデルとして検討した。

2-1 亜硝酸ソーダによる KI 液の酸化曲線の解析：KI 液を亜硝酸ソーダで酸化し、遊離したヨウ素をでん粉と反応し、ヨウ素でん粉反応による発色の吸光度を 20°C, 563 nm において経時的に記録した。

[図 4, A~F] で横軸に時間を、縦軸に 563 nm

の吸光度を示した。

① Toc. 類を添加した場合：Toc. 類では、反応開始後、徐々に吸光度が上昇し、一定時間後急激にしかも直線的に反応が進む。そして添加量が増加するに従って反応の始まりはゆるやかになり、後半の一定の速度で反応が進む部分もその速度が遅くなる [図 4, A~F]。

② AsA. を添加した場合：AsA. では一定時間酸化を完全に抑制した後、コントロールとほぼ同等の速度で反応が開始している為、反応曲線の後半の直線部分は、みなコントロールの傾斜と同様であった [図 4, F]。

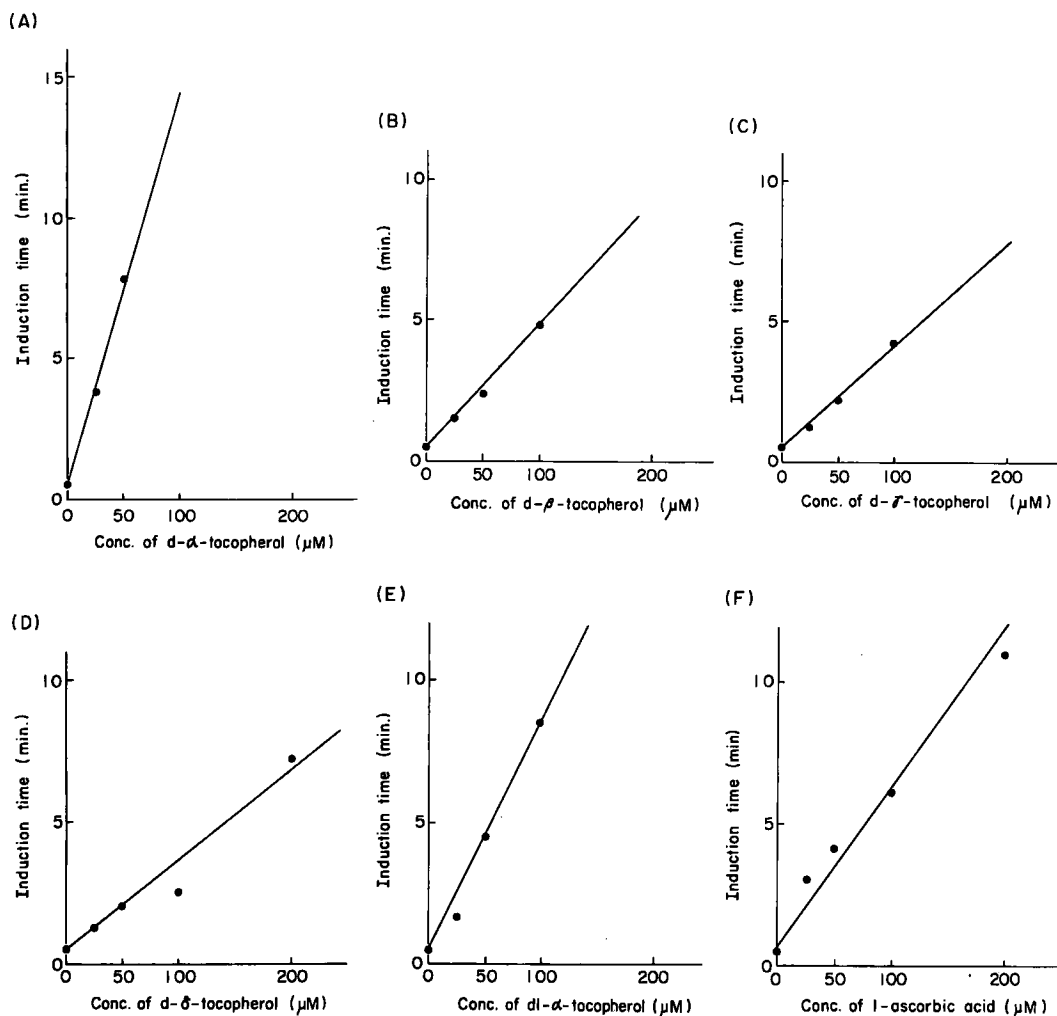


Fig. 5 (A~F) Inhibitory effects of tocopherol derivatives (A-E) and ascorbic acid (F) on the KI oxidation by nitrite ion.

(Relation between the concentration of Toc. and AsA. and the induction time)

③ Toc. 類, AsA. の抗酸化能のパラメーター : [図 4, A~F] において KI 液が亜硝酸に酸化され, 反応が急激に開始するまでの時間を誘導期と考え, 反応曲線の後半の直線部分を横軸まで延長し交わった所の時間を誘導期とし, 抗酸化能のパラメーターに用いた. [図 5, A~F] は, 横軸に, Toc. 類, AsA. とともに終濃度 ( $\mu\text{M}$ ) を, 縦軸には図 4 よりもとめた誘導時間 (分) を表示した.

2-2 AsA. および Toc. の種類による抗酸化能の比較 : Toc. 類, AsA. の添加終濃度の増加に伴いそれぞれの誘導時間はほぼ直線的に増加している. この時各図の直線の傾きがそれぞれの薬剤の抗酸化能と考えられるので, [図 5, A~F] をまとめて図 6 に示してみた. Toc. 類は実線で, AsA. は破線で表した. それぞれの直線の傾きにより,  $d-\alpha\text{-Toc.} > dl-\alpha\text{-Toc.} > \text{AsA.} > d-\beta\text{-Toc.} > d-\gamma\text{-Toc.} > d-\delta\text{-Toc.}$  の順に抗酸化能が強いと考えられる. これは, Toc. 類だけについて考えると, 亜硝酸ソーダによるメトヘモグロビン生成に対する Toc. 類の抑制力と同じ順序であった.

3. Toc. 類の亜硝酸ソーダによるヘモグロビンよりメトヘモグロビン生成の誘導期でみる抑制度と亜硝酸ソーダの KI 液酸化によるヨウ素生成に対する誘導期でみた抗酸化能

との相関関係

[図 2, A~F] において Toc. の添加濃度,  $d-\alpha$ ,  $dl-\alpha$  ( $116\mu\text{M}$ ,  $232\mu\text{M}$ )  $d-\beta$ ,  $d-\gamma$  ( $120\mu\text{M}$ ,

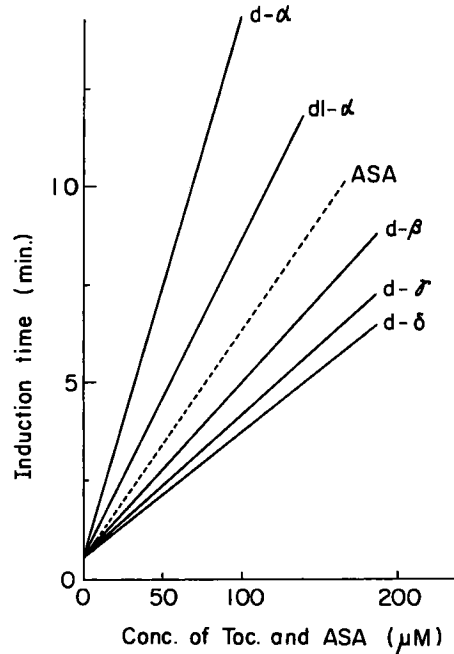


Fig. 6 Comparison of inhibitory effects of tocopherol derivatives and ascorbic acid on the KI oxidation. (Relation between the concentration of Toc. and AsA. and the induction time.)

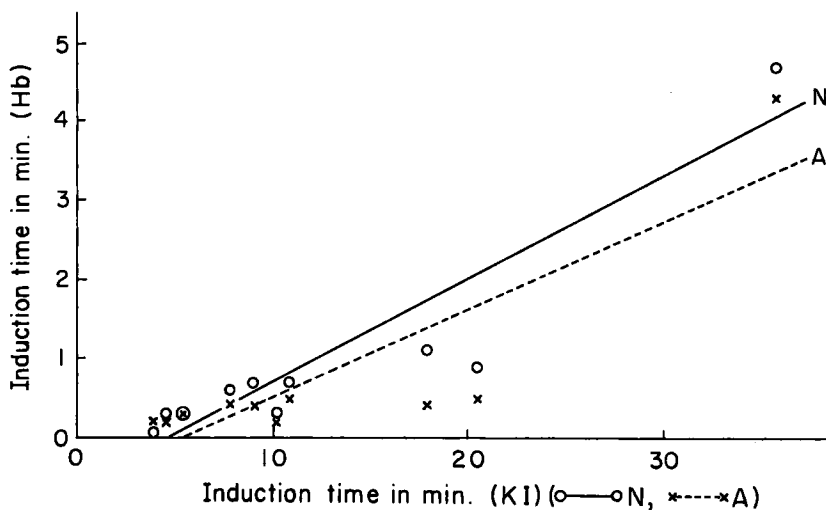


Fig. 7 Relation between the induction time of iodine formation from potassium iodine and that of methemoglobin formation from hemoglobin.



240  $\mu$ M) d- $\delta$  (124  $\mu$ M, 248  $\mu$ M) におけるヘモグロビンよりメトヘモグロビンを生成する時の誘導期の時間と、[図4, A~E]におけるKI液よりヨウ素に酸化される時の誘導期の時間で前述の濃度に対応する時間を図上より読みとり、両者の対応する点を図7に示した。横軸には、亜硝酸ソーダによるKI液よりヨウ素への酸化時の誘導時間(分)を、縦軸には亜硝酸ソーダによるヘモグロビンよりメトヘモグロビンを生成する時の誘導時間(分)を示した。KI液酸化時の誘導時間に対応する両種マウスの5種のToc.で2種の濃度の各10点を図にプロットした。これらの点について、正常マウス、アカタラセミアマウスそれぞれ相関係数および一次回帰式を求め以下の結果を得た。

正常マウス： $y=0.13x-0.62$

(相関係数  $r=0.92$ )

アカタラセミアマウス： $y=0.11x-0.65$

(相関係数  $r=0.86$ )

(ただし  $x$ : 亜硝酸ソーダによるKI液よりヨウ素への酸化時の誘導時間,  $y$ : 亜硝酸ソーダによるヘモグロビンよりメトヘモグロビンを生成する時の誘導時間)

また、正常マウスとアカタラセミアマウスの一次回帰式の傾きは正常マウスのそれの方が大きかった。

## 考 察

近年大気汚染物質中の窒素酸化物の有毒性が問題となってきた。高濃度の亜硝酸イオン<sup>10,11)</sup>あるいは、NO<sup>12)</sup>、NO<sub>2</sub><sup>13)</sup>ガスによりメトヘモグロビンが生成されることが報告されているがその生成機構はまだ不明な点が多いようである。我々は<sup>5)</sup>前報で、亜硝酸イオンにより、正常マウス、アカタラセミアマウス溶血液中で生成するメトヘモグロビンの生成速度に差があること、また、それにはカタラーゼが関与していることを述べた。前述したが、渡辺、緒方<sup>6)</sup>は、人のヘモグロビンで $\alpha$ -Toc.がメトヘモグロビンの生成を抑制するという *in vitro* の実験、また *in vivo* でネズミのビタミンE投与群に亜硝酸によりひきおこされるメトヘモグロビン生成に抑制が認められたことを報告している。今回

の我々は正常およびアカタラセミアマウス溶血液を用い、亜硝酸イオンによりひきおこされるメトヘモグロビンをToc.類(d- $\alpha$ , dl- $\alpha$ , d- $\beta$ , d- $\gamma$ , d- $\delta$ )また、AsA.で抑制する実験を行い、その効果に差を認めた。

ビタミンE(以下Eと略す)はEvans Bishop<sup>14)</sup>により1922年にみいだされ、Sure<sup>15)</sup>によりビタミンEの名称をあたえられた。そして生体内における抗酸化作用を中心とする種々の作用が報告され、注目される様になっている。

E同族体としては、自然界に、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ のトコフェロールと $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ のトコトリエノールの8種類のE作用物質が知られている。そして、その生物活性はそれぞれ異なり $\alpha$ -Toc.を100とすると $\beta$ -Toc. 30;  $\gamma$ -Toc. 10;  $\delta$ -Toc. は1以下である。また、トコトリエノールはトコフェロールに比べてはるかに活性が低い。

また、天然のd体、合成のdl体でもその活性に差があり、dl- $\alpha$ -Toc.を100とするとd- $\alpha$ -Toc.は166<sup>16)</sup>で、これはEの立体構造の違いによるものである。今回の我々の実験で、Toc.の種類の違いにより抗酸化作用が異なるが、ほぼこの生物活性と同様の活性順位であった。また、ヨウ化カリ水溶液から亜硝酸ソーダによりヨウ素を生成させこれをToc.類によって抑制する実験と正常およびアカタラセミアマウス溶血液のヘモグロビンより亜硝酸ソーダによりメトヘモグロビンを生成し、これを抑制する実験とは、各Toc.の濃度に対応させると、両者に相関関係(正常マウス： $r=0.92$ 、アカタラセミアマウス： $r=0.86$ )が認められた。このことより、Toc.類の亜硝酸ソーダによるヘモグロビンよりメトヘモグロビンを生成することに対する抑制力は、ヨウ化カリ水溶液より亜硝酸ソーダの添加によるヨウ素生成を抑制する抗酸化能とに相関関係があると考えられる。また、一次回帰式の傾きの差は正常マウス溶液とアカタラセミア溶血液に含まれるカタラーゼ量の差によるものと考えられる。すなわち、前報<sup>5)</sup>で述べたカタラーゼの差による亜硝酸ソーダにひきおこされるヘモグロビンよりメトヘモグロビンの生成の差は、Toc.類を添加した条件下でも同様であった。したがってカタラーゼの存在はメトヘモ

グロビン生成の抑制に本質的に関与していると考えられる。

AsA. については、還元力もあり、抗酸化作用と言えるかどうかかわからないが、Toc. と較べてヘモグロビンがメトヘモグロビンになるのを非常に少量で抑制した。

ビタミン E と他物質との共存については *in vitro* において、ビタミン C<sup>17)</sup>、グルタチオン<sup>18)</sup>、リン脂質<sup>19)</sup>、アミノ酸類<sup>20)</sup> などの化合物とは相乗的な抗酸化作用があるのが認められている。例えばビタミン C との共存下で、ビタミン E が作用して、ラジカルを捕捉し、その際生成する E ラジカルはビタミン C と反応して E を再生すると考えられる。また、E ラジカルにビタミン C やグルタチオンを加えた時 ESR により E ラジカルの消失をみる事が報告<sup>21)</sup> されている。この点については今後検討を進めたいと考えている。

カタラーゼが亜硝酸イオンによるメトヘモグロビンの生成を抑制することを前述したが本実験で Toc. 類を添加した時、正常およびアカタラセミアマウス溶血液の亜硝酸イオンによるメトヘモグロビン生成の抑制力がその添加量の増大につれてより大きく差がでる。これは、生体内カタラーゼがメトヘモグロビン生成の抑制に本質的に作用しており、これに対して Toc. 類が相加的にはたらいっていると推定されるが、さらに検討する必要があると考える。

## 結 論

亜硝酸イオンによる正常、およびアカタラセ

ミアマウス溶血液中のメトヘモグロビン生成に対するトコフェロール類、およびアスコルビン酸の抑制作用を検討し、以下の結果を得た。

1. トコフェロール誘導体を添加した場合には、0~500 $\mu$ M の終濃度において、濃度の増加にしたがい亜硝酸イオンによるメトヘモグロビン量の増加を減少させる。そして同一濃度においては、アカタラセミアマウスのメトヘモグロビン生成量は正常マウスのそれより高かった。
2. アスコルビン酸の添加量は、終濃度 0~1.2 $\mu$ M でトコフェロール類と比較して低濃度で亜硝酸イオンによるメトヘモグロビン生成を抑制した。同一濃度添加のさいのメトヘモグロビン生成の抑制は、低濃度では、アカタラセミアマウスより、正常マウスの方が大きい。トコフェロール類ほど差が認められなかった。
3. トコフェロール誘導体の亜硝酸イオンによるメトヘモグロビン生成の抑制力は  $d-\alpha > dl-\alpha > d-\beta > d-\gamma > d-\delta$  の順に強く、トコフェロールの生物学的活性に一致した。

ヨウ化カリ水溶液を用いて行ったトコフェロール誘導体の抗酸化能についての実験においても同様の順位であった。

稿を終るにあたり、絶えず御指導、御校閲をいただいた岡山大学医学部公衆衛生学教室緒方正名教授に深謝いたします。

## 文 献

1. Shy CM: The Chattanooga school children study ; Effects of community exposure to nitrogen dioxide I methods description of pollutant exposure, and results of ventilatory function testing. J Air Pollut Control Assoc (1970) 20, 539-545.
2. Shy CM: The Chattanooga school children study ; Effects of exposure to nitrogen dioxide II, Incidence of acute respiratory illness. J Air Pollut Control Assoc (1970) 20, 582-588.
3. 渡部 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, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1979) pp 225-236.
4. 上代皓三:無カタラーゼ症. 血色素の生理と臨床, 上代皓三, 中尾喜久監修, 医学書院, 東京 (1958) pp 568.

5. 井奥尚也：亜硝酸イオンによる正常およびアカタラセミアマウス溶血液のメトヘモグロビン生成の差異について，岡山医学会雑誌（1987）投稿中。
6. 渡辺真策，緒方正名：亜硝酸によるメトヘモグロビン生成について，ビタミン E のメトヘモグロビン生成の抑制作用．第55回日本産業衛生学会，第32回日本産業医協議会講演集，名古屋（1982）pp 312-313.
7. Feinsein RN: Perborate as substrate in a new assay of catalase. *J Biol Chem* (1949) **180**, 1197-1202.
8. Van Assendelft OW: Spectrophotometry of Haemoglobin Derivatives, Royal Vangorcum Ltd, Assen Netherland (1970).
9. Betke K, Greinacher I, Teize O: *Arch Exp Pathol Pharmacol* (1956) **229**, 220.
10. 柿崎敏雄他：亜硝酸ソーダによるオキシヘモグロビンの酸化について．生化学（1964）**37**, 14.
11. 中馬一郎，小坂博昭：亜硝酸塩によるオキシヘモグロビンのメトヘモグロビンへの酸化反応．環境科学研究報告集，文部省「環境科学」特別研究 B-216-21-3（1984）pp 11.
12. 志賀 健：一酸化窒素の赤血球障害機構．環境科学研究報告集，文部省「環境科学」特別研究 B-216-21-3（1984）pp 1.
13. Mccord CP: A chemical and physiological investigation of electric arc welding III, Coated welding rods. *J Ind Hyg Toxicol* (1941) **23**, 200-215.
14. Evans HM and Bishop KS: The existance of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. *Science* (1922) **56**, 650.
15. Sure B: The existance of a specific vitamin for reproduction. *J Biol Chem* (1924) **58**, 693.
16. Ames SR: Biopotencies in rats of several forms of alpha-tocopherols. *J Nitr* (1979) **109**, 2198.
17. 福沢健治：ビタミン E. *ビタミン* (1984) **58**, 517-524.
18. Reddy CC, Scholz RW and Tomas CE: Vitamin E dependent reduced glutathione inhibition of rat liver microsomal lipid peroxidation. *Life Sci* (1982) **31**, 571-576.
19. Hildebrand DH, Terao J and Kito M: Phospholipids plus tocopherol increase soybean oil stability. *J Am Oilchem Soc* (1984) **61**, 552-555.
20. 渡辺幸雄，綾野雄幸： $\alpha$ -トコフェロールの抗酸化性に対するアミノ酸添加効果について，栄養と食糧（1972）**25**, 621-625.
21. Niki E, Tsuchiya J and Tanimura R: Regeneration of vitamin E from  $\alpha$ -chromoxy radical by glutathione and vitamin C. *Chem Lett* (1982) 789-792.

**Inhibitory effects of tocopherol derivatives and ascorbic acid  
on the methemoglobin formation by nitrite ion in the blood  
of normal and acatalasemic mice**

**Naoya IOKU**

**Department of Public Health, Okayama University Medical School,  
2-5-1 shikata-cho, Okayama Japan**

**(Director : Prof. M. Ogata)**

The inhibitory effects of tocopherol derivatives and ascorbic acid on methemoglobin formation by nitrite ion in the bloods of normal and acatalasemic mice were examined. Methemoglobin formation by nitrite ion was inhibited by tocopherol derivatives at final concentrations ranging from 0 to 500  $\mu\text{M}$ . Methemoglobin formation in the acatalasemic blood was higher than that in the normal blood at the same concentration of tocopherol derivatives. The inhibitory effects of tocopherol derivatives on the methemoglobin formation in the bloods of both normal and acatalasemic mice were in the descending order of d- $\alpha$ , dl- $\alpha$ , d- $\beta$ , d- $\gamma$  and d- $\delta$ . This is order coincides with the order of biological activity. Ascorbic acid inhibited methemoglobin formation by nitrite ion at the final concentrations ranging from 0 to 1.2  $\mu\text{M}$ . The inhibitory effect of ascorbic acid was markedly lower than that of tocopherol. Methemoglobin formation in the acatalasemic blood was slightly higher than that in the normal blood at the same concentration of ascorbic acid.