

# 分光光度法による人血液カタラーゼ活性の定量および 低カタラーゼ血液症のスクリーニング法について

## 第 1 編

### 直読式分光光度計による正常血カタラーゼ活性の測定

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: \* 緒方正名教授, \*\* 高原滋夫教授)

助 手 中 川 嘉 人

〔昭和43年4月12日受稿〕

#### 目 次

I. 緒 言	b. 分光光度計法 (以下UV法と略す)
II. 実験材料ならびに実験方法	III. 実験成績
1. 実験材料	IV. 総括ならびに考案
2. 実験方法	V. 結 論
a. 滴定法	

#### I. 緒 言

無カタラーゼ血液症<sup>1)2)</sup> (acatalasemia) の異型接合体 (heterozygote) である低カタラーゼ血液症<sup>3)4)</sup> (hypocatalasemia, 以下低「カ」血液症と略す) の頻度の研究は住民や民族間に於ける acatalasemic gene distribution の研究に関連する非常に大切な課題である。

低「カ」血液症の頻度を求めるためには低「カ」血液症の確認法として又はスクリーニング法の基礎研究として血液カタラーゼ活性を測定する事が必要である。

血液カタラーゼの定量及び低「カ」血液症のスクリーニングには従来より Euler-Josephson 等による滴定法を応用して低「カ」血症を check する所謂 Kobara 氏法が用いられて来た。これらの方法の原理はカタラーゼによつて基質の  $H_2O_2$  は減少するがその際残留する  $H_2O_2$  を  $KMnO_4$  で滴定する方法である。一方1952年 Beers 等<sup>6)</sup> は結晶牛肝カタラーゼを用いて残存する  $H_2O_2$  量を  $240m\mu$  に於ける吸光度 (optical Density) によつて測定する方法を記載した。この方法は直接  $H_2O_2$  そのものの減少を追求できるので非常に原理的に Simplify されたかたちで

あり、測定誤差も少なく測定値の信頼度が高いものと考えられる。しかしながらこの方法を人血液カタラーゼの定量に応用した例はみられない。過マンガン酸カリ滴定法では硫酸によりカタラーゼ反応を停止させた後、残存する  $H_2O_2$  を  $KMnO_4$  を用いて滴定するために  $KMnO_4$  の呈色による end point の判定を術者の視覚に頼るため測定値は術者の熟練の度合に影響されないとも云えない。しかるに本法では反応中の  $H_2O_2$  の分解消失の状況が客観的に分光光度計により瞬間的に追跡されるので方法として直接的かつ合目的と考えられる。従つてその正確度は術者の熟練よりも器械そのものの性能にかかる点が大いものと考えられる。

本研究の目的は Beers 等の方法を血液カタラーゼ活性の定量に応用し、更に低「カ」血症のスクリーニング法、又は確定法としての利用を計る事である。かつ本法を用いてカタラーゼ酵素の反応速度論的方面 (Enzyme Kinetics) の研究にも資せんとするものである。

本編では実験材料として低「カ」血症血液1例及び正常人血液9例を用い、その各々のカタラーゼ活性を直読式分光光度計によつて測定を試み、ほぼ同一条件下で行なつた滴定法による測定成績と比較検

\* 岡山大学医学部公衆衛生学教室    \*\* 岡山大学医学部耳鼻咽喉科学教室

討したのでここに発表する。

## II. 実験材料並びに実験方法

### 1. 実験材料

被検血液として低「カ」血症：世〇静〇（福岡）（記号 Y〇）の血液を採血後氷室に3日保存したもの及び正常血として和歌山市某団地住民の集団採血を行ない氷室に1日保存したもの（記号 No. 1-9）を用いた。血液は被検者の肘静脈より採血し血液 5 ml に対して heparin (1ml 中に 1,000 単位含有) を1滴の割合で加えた。

### 2. 実験方法

#### a. 滴定法 (titration method)

Euler-Josephson 等による滴定法の変法<sup>3)</sup>を用い、次の如くしてカタラーゼ活性を測定した。即ち基質液 (0.01M phosphate buffer, pH 6.8 に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を終濃度 0.01N になるように加えたもの) を5本の試験管に 5ml 宛とり UV-spectrophotometry を行なつたのと同一室温に暫くおき、ピペットを用いて各試験管内に 1,000 倍溶血液 1ml を手早く吹き入れた。同時にストップウォッチをスタートさせ正確に15秒の後に 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 5 ml を直ちに加えて反応を停止させた。同様に残りの試験管 3本に夫々30秒, 45秒及び60秒の順に H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えた。反応終了後各試験管の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度は 0.005N-KMnO<sub>4</sub> を用いて滴定法によつて測定した。尚最初の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の濃度を知るために第5番目の試験管に溶血液を加える前に H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を加えたものを同様に滴定を行なつた。

上記の状態でカタラーゼによる H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の消失は熱力学の第一法則 (first order kinetics) に従っている<sup>7)</sup>。それ故反応速度恒数 k<sub>1</sub> は下記の式によつて各反応時間について計算する。

$$k_1 = \frac{1}{t} \log \frac{X_0}{X} \quad (\text{sec}^{-1}) \dots \dots \dots (1)$$

(1) 式で X<sub>0</sub> は過マンガン酸カリの ml 単位で表わした最初の H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度であり、X は t (秒) における濃度である。1000倍溶血液を用いているので4つの測定値の平均を 10<sup>3</sup> したものを血液原液中の赤血球カタラーゼ活性度として表わすのに使用した。即ち Cat K=1000k<sub>1</sub> で表わした。

滴定法では特に反応温度を 37°C とせず測定時、UV法と同じ室温 (31°C) の下に行つた。

従つて次に述べる分光光度計による測定成績と比較する場合温度差の問題を無視できるものと思われる。尚 Hb 値測定も全検体について併せて行なつた。その際 14g/dl の Hb 濃度の血液カタラーゼ活性値を 1 として修正を行ない、K<sub>cat</sub> として表わした。

#### b. 分光光度計法 (UV-spectrophotometry)

溶血液は滴定法で用いたものをほとんど同一時間 (溶血後 3 分以内) に本実験に使用した。測定操作として分光光度計 (Hitachi GPO 直読型) の波長を 240 mμ に固定し上記 phosphate buffer をブランクとして O. D. = 0 に器械を調節した。水晶セル\*<sub>1</sub> に基質液 (0.01 Mol, phosphate buffer に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を終濃度 0.0125 Mol になるように加えたもの) を 2.5 ml 採り、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の吸収が 0.0125 Mol 濃度に相当する O. D. = 0.5 に合うか否か確かめる\*<sub>2</sub>。次に 1,000 倍溶血液 0.5 ml を勢よく上記セル内に注入して反応を開始させる\*<sub>3</sub>。

次で手早く試料室の蓋を閉ざし反応開始15秒後より15秒毎に O. D. (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の残存量による O. D. と溶血液による O. D. の和として表わされる。) の読みを記載し反応開始後 3 分迄経時変化を追求した。UV 法の反応系は滴定法に比べて H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 濃度のみが 2.5 倍の高濃度であり反応液量は滴定法の 2 分の 1 として滴定法に準じた。(尚基質濃度とカタラーゼ活性値との関係については第 3 編に述べる) 測定時室温は 31°C であつた。そして UV 法では同一溶血液を用いて 3-5 分以内に引続き同一実験を 1乃至 2 回繰返して行なつた。

血液の Cat k は次の式 (2) より求めそれを 1,000 倍したものである。

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{x_1 - b}{x_2 - b} \quad (\text{sec}^{-1}) \dots \dots \dots (2)$$

算出法として各件 (i) を、次いで (ii) を用いて試みた。

$$(i) \quad \begin{cases} x_1 : t_1 = 30 \text{ (sec)} \text{ に於ける O. D. の読み} \\ x_2 : t_2 = 90 \text{ (sec)} \text{ に於ける O. D. の読み} \\ t : 60 \text{ (sec)} \quad (t_2 - t_1 = 60 \text{ (sec)}) \\ b : \text{溶血液による O. D. であり多くの実測} \end{cases}$$

\*<sub>1</sub> 水晶セルは発泡を防ぐために中性洗剤を用いて高度に清浄なものを用いる。

\*<sub>2</sub> 被検液量が少ないため透光面に空間を生じることのないよう器械とセルホルダーの透光面を狭くする場合がある。

\*<sub>3</sub> 水晶セル内の発泡を防ぎ、かつよく混合するように最初弱く、中程で強く、最後に弱く吹込む必要がある。

値の平均より 0.08 を用いた。

- (ii)  $\left\{ \begin{array}{l} x_1 : t=60 \text{ (sec)} \text{ に於ける O. D. の読み} \\ x_2 : t=120 \text{ (sec)} \\ t : 60 \text{ (sec)} \\ b : \text{溶血液による O. D. ((i) と同じく} \\ \quad 0.08 \text{ と一定にする)} \end{array} \right.$

### III. 実験成績

Fig. 1 は  $H_2O_2$  に対する正常血液及び低「カ」血症血液カタラーゼ反応の実験をグラフに記載したものである。グラフは時間(横軸  $x$ ) に対する  $H_2O_2$  濃度(縦軸  $y$ ) の変化を表わし、 $y$  軸には O. D. (240  $m\mu$ ) を対数軸上に plot している。

$x$  と  $y$  とはほぼ直線状を示しており、これは血液カタラーゼによる  $H_2O_2$  の分解反応がほとんど一次反応に合致することを示している。

Table 1 は低「カ」血症血液 1 例及び正常人血液 9 例について滴定法ならびに UV 法を用い、既述の方法によつて Cat  $k$  を求めた成績を示す。その際 Hb 値によるカタラーゼ活性値の修正値の算出を行ない別欄(※)に記載した。

滴定法と UV 法とによる 31°C に於ける測定成績を比較するために各測定値を滴定法 ( $x$ )、UV 法 ( $y$ ) としてグラフに描記すると Fig. 2 の如くである。図中点線は  $y$  の  $x$  に関する回帰直線を示す。

Fig. 1 正常人及び低「カ」血症血液カタラーゼ活性度の UV 法(日立 GPO 直読型)による測定例

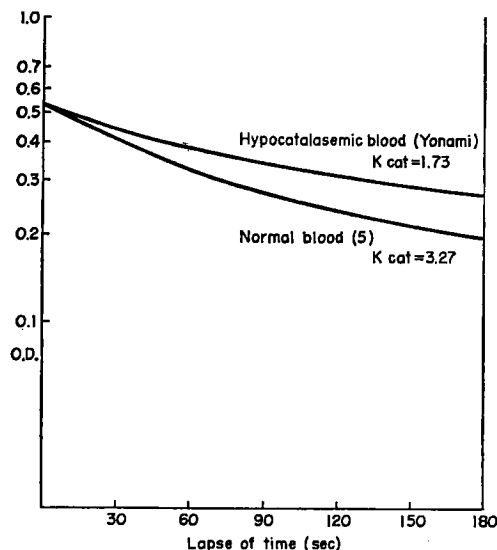


Fig. 2 に於ける  $K_{cat}$  は滴定法、UV 法とも Hb 値による修正値を用い UV 法測定値は第 1 回目の測定値を用いた。

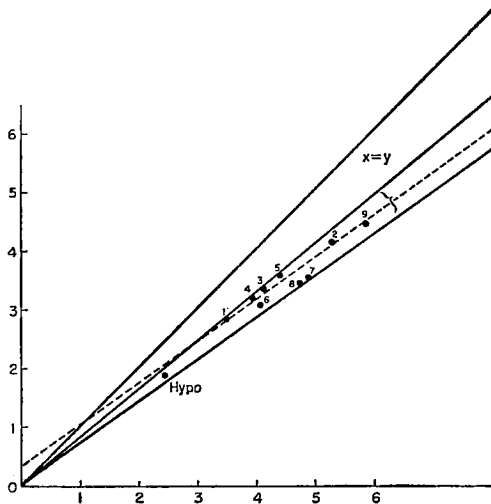
各点の存在範囲はほぼ直線上に配列され UV 法の測定値は滴定法の測定値の 71~82% の範囲内にあり正の相関を示した。

次に滴定法、UV 法によるカタラーゼ活性値を棒

Table 1 正常人および低「カ」血症血液カタラーゼ活性度の滴定法および UV 法による測定値, 31°C

検 体 番 号	測 定 法						Hb 値 g/dl	UV <sub>1</sub> /Tit
	滴 定 法		U V 法					
			第 1 回		2 回	3 回		
		※	$x_1 : t=30''$ $x_2 : t=90''$	※	$t=30''$ $t=90''$	$t=30''$ $t=60''$		
Hypo (Yonami)	2.28	2.42	1.73	1.83	0.87	1.23	13.2	0.759
Normal 1	2.97	3.41	2.43	2.79	2.45	2.33	12.2	0.818
2	3.35	5.27	2.62	4.12	2.68		8.9	0.782
3	3.76	4.11	3.09	3.38	2.69		12.8	0.822
4	3.80	3.86	3.10	3.26	2.55		13.3	0.816
5	4.00	4.41	3.27	3.61	3.03		12.7	0.818
6	4.37	4.08	3.29	3.07	4.03	3.41	15.0	0.753
7	4.62	4.90	3.30	3.50	3.27		13.2	0.714
8	4.61	4.71	3.35	3.42	3.30	3.25	13.7	0.727
9	4.55	5.90	3.47	4.50	3.34	3.25	10.8	0.763
$\Sigma$ n/10	3.831	4.307	2.995	3.348			12.58	0.777

Fig. 2 正常人および低「力」血症血液カタラーゼ活性度の滴定法 (x) と UV 法 (y) とによる測定成績の比較, 31°C, ..... 回帰直線



グラフに表わして Cat k の小さいものから大きいものの順に並べると Fig. 3 の如くである。尚 UV 法測定値は左から右への順で第 1, 2, 3 回の実験成績を並べてある。これより UV 法では検体記号 4, 5, 7, 8, 9 に示す如く同一検体, 同一溶血液を用いて 3-5 分以内に引続き同一実験を繰返して行なうと Cat k は溶血後の時間経過と共に僅かずつ低下した。

しかし他の検体記号のものに関しては必ずしも Kcat 値が順次に低下する傾向を示さなかつた。

#### IV. 総括並びに考按

人血液カタラーゼ活性を滴定法と UV 法で測定して Cat k を比較すると一般に UV 法の方が滴定法に比べて低い値を示した。

測定結果に関しては両者は相対的なものであるから一概にいえないが、滴定法の場合術者の技術的熟練度に影響され易いが、UV 法の場合器械の性能によるところが大きく比較的初心者にも容易である。

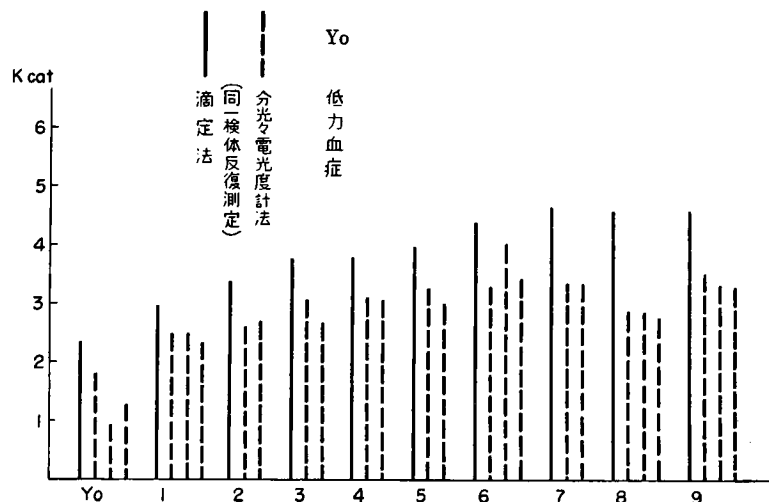
滴定法に比べて UV 法による Cat k が低い値を示す原因に関して検討を加えると以下の如くである。

(i) 滴定法では反応を停止させる為  $H_2SO_4$  を用いるが、 $H_2SO_4$  注入後瞬時に反応は停止せずきわめて短時間でも引続いて反応が継続した後完全に停止するのではないかということが考えられる。

(ii) 滴定法では式 (1) に於いて  $x_0$  は  $t=0$  における  $H_2O_2$  量に相当するが、UV 法では  $t=0$  に於ける  $x_0$  は一応測定不能のため (強いて求めるとすれば外挿法による推測値を求め得る)  $t=30''$  又は  $t=60''$  における Optical Density を用いた。カタラーゼ反応は反応開始後時間の経過と共に次第に一次反応 (first order reaction) からはづれた低い値を呈してくるものと考えられるのでこのことも多少の影響を与えているであろう。

次に UV 法の変動の要因については以下のことが考えられる。即ち式 (2) において b を 0.08 に一定したが、これは本来それぞれ測定する必要がある。しかし殆ど 0.05~0.1 の範囲内の値であり正確な測定が煩雑なため 0.08 に一定した。従つて実際の b

Fig. 3 正常人および低「力」血症血液カタラーゼ活性度と UV 法とによる測定成績の比較, 31°C



が0.08よりも大きい値であるならば Cat k は少し大きな値を示し、0.08よりも小さい値ならば Cat k はより小さい値を示すことになるが、最小0.05から最大0.1迄の幅による影響は±10%以内の変動であることが確かめられた。

尚両方の相関的確實性に関する統計的処理及び人血液カタラーゼ活性測定のための本法実施に際して遭遇した基質濃度とカタラーゼ活性との関係、一次反応適合範囲等に関する実験は第2, 3編に述べる。

## V. 結 論

低「カ」血症をスクリーニングする目的で人血液カタラーゼ活性を分光光度計を用いて測定する方法を試みた。即ち低「カ」血症血液1例と正常血9例を用いて分光光度計による測定(UV法)を行ない同時に行なつた滴定法による測定値と比較検討した。その成績は以下の如くである。

## 文 献

- 1) Takahara, S. & Miyamoto, H.: J. Otorhinolaryngological Soc., Japan 51, 163, 1948
- 2) Takahara, S.: Lancet 2, 1101, 1952
- 3) Nishimura, S. et al.: Science 130, 333, 1919
- 4) Takahara, S. et al.: J. clin. Invest. 39, 610, 1960
- 5) Von Euler, N. and Josephson, K.: Ann. chem.

1) 両測定法による Cat k は同じ値又はそれに近い値を示すものと期待されたが両値は正の相関を示し UV法による測定値は滴定法の71~82%の範囲内の低い値を示した。尚低「カ」血症血液は UV法で正常血と明らかに判別できる低い値を示した。

2) 1, の原因に関して硫酸注入後の反応停止迄の時間、反応時間のとり方について若干の考察を行なつた。

本論文の要旨は第8回日本人類遺伝学会総会および第34回日本衛生学会総会において発表した。

擧筆するに当り御懇篤なる御指導御校閲を賜つた恩師緒方正名教授並びに高原滋夫教授に深甚の謝意を表します。又終始御好誼、御鞭撻をいただいた小倉義郎助教授、広島日赤病院武内元成博士に、更に教室の諸先輩諸兄に感謝致します。

- 452, 158, 1927
- 6) Beers, R. F., Jr. & Sizer, I. W.: J. Biol. chem. 195, 133, 1952
- 7) Takahara, S., et al.: Hypocatalasemia; A new genetic carrier state ABCC Technical Report 05-59, 3, 1959

# Studies on the Measurement of Human Blood Catalase Activity and the Screening Method of Hypocatalasemia by Spectrophotometry

## Part 1. Measurement of Human Blood Catalase Activity by Spectrophotometry (with a Hitachi GPO Model)

By

Yoshito NAKAGAWA

Department of Public Health, Okayama University Medical School, Okayama, Japan  
(Director: Prof. Masana OGATA)

### Author's Abstract

Study on the frequency of hypocatalasemia, heterozygote of acatalasemia, has an extremely important bearing on acatalasemic gene distribution.

For the identification of hypocatalasemia or for its screening, it is essential to study the methods of quantitative analysis of blood catalase.

For such a quantitative analysis as well as for the screening test, a modified form of Euler-Josephson's method has been used by Okayama University Medical School and by Hiroshima and Nagasaki ABCC groups (Atomic Bomb Casualty Commission). This method is based on titration with potassium permanganate ( $\text{KMnO}_4$ ) to determine decrease of hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) by blood catalase.

On the other hand, Beers *et al.* described a method of liver catalase assay for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by estimating the decrease in the optical density at the wave length of  $240\text{m}\mu$ . As it is possible to check directly the decrease of  $\text{H}_2\text{O}_2$  with this method, it seems to be the most simple and highly reliable method with little error.

The purpose of this paper is an attempt to determine the catalase activity of human blood and to apply the identification of hypocatalasemia and normal individuals and, if possible, to employ as an assay method for investigating hypocatalasemic blood catalase from the aspect of enzyme kinetics by spectrophotometry (ultraviolet method).

In this part an attempt was made to determine the catalase values of some blood samples. The results of this determination were compared with those obtained by the titration (modified Euler-Josephson's method) with the same samples under approximately the same condition.

It was observed that the catalase values as estimated by the ultraviolet method (UV method) were about 70 to 80 per cent lower than those by the titration.

---