

分光光度計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 2 編

恒温ならびに自記記録装置を装着して正常及び
低「カ」血症血液の測定

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
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

人血液カタラーゼ活性の測定に関して第1編（緒編）において滴定法および紫外部吸収分光光度計法（以下UV法と略す）による室温下の測定ではUV法による Cat k は滴定法のその約70~80%の範囲の値を示す事を発表した。然し乍ら前報では測定温度が31°Cであり、亦直読法によるため客観性が低いと考えられる。そのため本編では測定を一層正確、かつ簡便に行なうために分光光度計（Hitachi Perkin-Elmer 139型）にセル恒温装置（Hitachi 139-0880恒温セル付属装置及び Tazirikikai 電子恒温槽 ECW-108W）並びに自記記録装置（Hitachi QPD33 型卓上記録計）を装備した。且つ低「カ」血症症例を増し7例を実験に用いた。測定実験はUV法を従来より行なわれてきたところの Euler-Josephson 等による滴定法の変法と比較するために滴定法と共に同じ温度（37±1°C）下に行なつた。

II. 実験材料並びに実験方法

1. 実験材料

正常人18人，低「カ」血症7人より適時採血を

行ないその都度実験を行なつた。採血の際は肘静脈より行ない血液 5ml に対し heparin (1ml 中に1,000 単位含有) を1滴の割合で加えた。血液は氷室（約5°C）に1~3日保存したものを実験に用いた。

2. 実験方法

a. 滴定法

Euler-Josephson 等による滴定法の変法を用いて第1編に述べたとほとんど同様の方法で測定を行なつた。前編では室温による測定であつたが本編では実験実施前に基質液を5本の試験管に5ml宛とり、これら試験管を予め恒温槽中で37°Cに加温しておいて実験を行なつた。

b. UV法

本法の原理ならびに実験方法は第1編に述べたが分光光度計（Hitachi Perkin-Elmer 139 type）に新に循環式恒温槽及び自記記録計を装着して実験を行なつた。これらによつて cuvette の基質液の温度を37±2°Cに調節維持して滴定法の条件と一致させると共に吸光度の変化を自記記録計の Chart に記録させることにより反応の初速度（Initial Velocity）をできるだけ正確に把握し、一層厳密な測定成績が得られることを期待した。

* 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

被検溶血液の調製は氷室に保存した血液より滴定法と UV 法の何れの場合も測定の数毎にメランジュールを用いて採取し、蒸留水で希釈した。溶血液の活性度の低下をさけるために同一溶血液を続いて実験に用いることは行なわなかつた。

基質溶液としては 0.01 Mol phosphate buffer (pH6.8) に H₂O₂ を終濃度 0.0125 Mol となるように調製した溶液を用いた。

この基質溶液 2.5 ml に 1,000倍溶血液 0.5 ml を加えて反応を行なわせた。

以上の実験結果を chart に記録された透過率 (Transmittance) より吸収度 (O.D.) に換算し、1 次反応式に従ってカタラーゼ活性値を求めた。

$$k = \frac{1}{t} \log \frac{x_1 - b}{x_2 - b} \dots \dots \dots (1)$$

x₁: t = 0 (sec) に於ける O. D. の読み (外挿値)

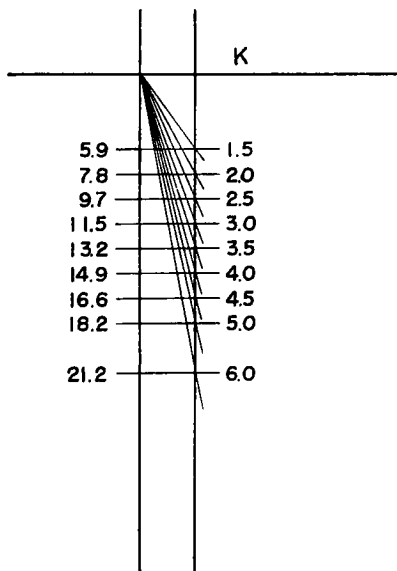
x₂: t = 60 (sec) に於ける O. D. の読み

t: 60 (sec)

b: 溶血液による O. D. の読み, 便宜上仮りに 0.1 と一定とした。

なお, 実際には常に既述の実験条件下に測定するので記録 (chart) より簡便に活性値を得るために分度器様の尺度計 (Fig. 1) を工夫作製した。尺度計の作り方は次の如くである。

Fig. 1 UV法による簡易定量用尺度計
0.0125 M H₂O₂ in 0.01 P. B. 2.5cc
Plus×1000 Hemolysate 0.5cc



なお chart speed は 1cm/min に固定した。尺度

計上の Cat k に相当する検量線は以下の原理によつて作製した。即ち式 (1) において t = 0 における x₀ を T₀ とすれば多数の血液カタラーゼ実測値より外挿して得た値より x₀ = 0.49 で T₀ = 33% (T は透過率) となる。

b = 0.1 (O. D.) で一定と考える。

t = 60秒において k = 1.5 における x₆₀ は式 (1) より求め得る。即ち $1.5 = \frac{1}{60} \log \frac{0.49 - 0.1}{x_{60} - 0.1}$ より x₆₀

を求めると x₆₀ = 0.41 (O. D.) であり、従つて T₆₀ = 38.9% を得る。同様にして k = 2 以上の場合も k より逆算して T を求めて記録紙上に Plot する。便宜上 0 と 60 秒の間の T の変化を直線であると仮定して T₀ と T を結ぶ直線が t = 0 ~ 60 秒における k のそれぞれを表わすのでこれを透明なセルロイド板にうつしたものが Fig. 1 に示す如き尺度計である。

このようにして UV 法による測定を基質の H₂O₂ 濃度が滴定法の場合の 2.5 倍であること以外には温度及び反応系など滴定法と殆ど同一条件下に同一検体を用いて行ない、滴定法と UV 法とによる両者の測定成績を比較検討した。

III. 実験成績

以上の如くして正常人血液 18 例, 低「カ」血液 7 例について求めたカタラーゼ活性値 (k cat) はそれぞれ Table 1, 2 に示す如くである。

なお k cat は 14g/dl Hb の Cat k として修正を行なつた値を用いた。Fig. 2 は正常人血液, Fig. 3 は低「カ」血症血液の実際の測定を行なつた chart を示す。何れも同一標本について引続き 3 回測定を行ない、算術平均を求めてその個体の測定値とした。

1 標本の検査における 3 つの k cat はおおむね一致しているが、かかる測定値 10 組 (正常人 5 例, 低「カ」血症 5 例) を任意抽出して解析を行なつた結果, 3 回測定値に対する標準偏差の算術平均は正常人及び低「カ」血症についてそれぞれ 0.098, 0.056 k cat 単位であつた。亦変異係数の算術平均は同じくそれぞれ 0.027, 0.035 であつた。

Fig. 4 は正常血液 18 例, 低「カ」血症血液 7 例について滴定法と UV 法とによつて測定した値を両方法に関して比較し相関関係を示したものである。UV 法による各測定値は滴定法による値の約 90% を示した。UV 法測定値を滴定法測定値で際した値 (UV/Tit.) は

正常人血液 18 例の場合は 0.91

Table 1 正常人血液カタラーゼ活性の測定値, 37°C

検体番号	測定法		H b 値 g/dl	UV/Tit
	滴定法	UV法		
1	3.05	2.80	13.5	0.918
2	3.15	2.23	15.7	0.708
3	5.50	5.00	14.0	0.909
4	3.02	2.42	15.2	0.801
5	3.33	3.02	13.9	0.907
6	4.72	3.96	17.8	0.839
7	4.38	4.43	16.9	1.011
8	4.31	4.10	14.5	0.951
9	5.01	4.99	14.6	0.996
10	4.27	4.39	9.5	1.028
11	3.14	3.06	15.8	0.975
12	4.92	4.92	13.8	1.000
13	3.44	3.21	13.6	0.933
14	3.88	3.56	11.4	0.912
15	5.44	5.15	13.6	0.947
16	4.42	4.27	11.7	0.966
17	3.87	2.94	17.5	0.760
18	4.70	3.50	17.8	0.745
$\frac{\sum}{n}$	4.141	3.775	14.489	0.906

Table 2 低「カ」血症血液カタラーゼ活性の測定値, 37°C

検体番号	測定法		H b 値 g/dl	UV/Tit
	滴定法	UV法		
1	2.00	1.72	15.5	0.860
2	2.00	1.70	12.9	0.850
3	2.27	1.64	13.4	0.722
4	2.08	1.46	13.6	0.702
5	2.07	1.39	15.8	0.671
6	2.22	2.00	11.6	0.901
7	2.64	2.02	13.6	0.765
$\frac{\sum}{n}$	2.18	1.70	13.771	0.782

低「カ」血症血液7例の場合 0.78
 合計25例の場合は 0.87
 であり相関係数は同じくそれぞれ
 正常人血液18例の場合 0.92
 低「カ」血症血液7例の場合 0.73
 合計25例の場合 0.96
 であり、何れの場合の相関も危険率0.1%で有意であつた。亦、X：滴定法、Y：UV法としてYのXに対する回帰方程式はそれぞれ
 $Y = 1.04X - 0.51$

Fig. 2 UV法による正常血カタラーゼ活性測定例, 37°C

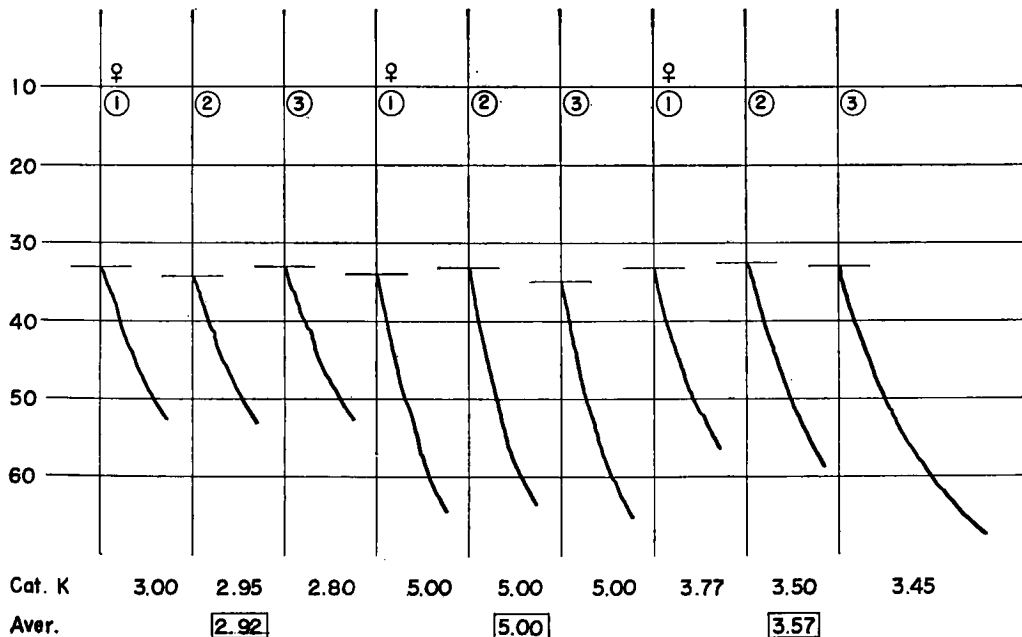


Fig. 3 UV法による低「カ」血カタラーゼ活性測定例, 37°C

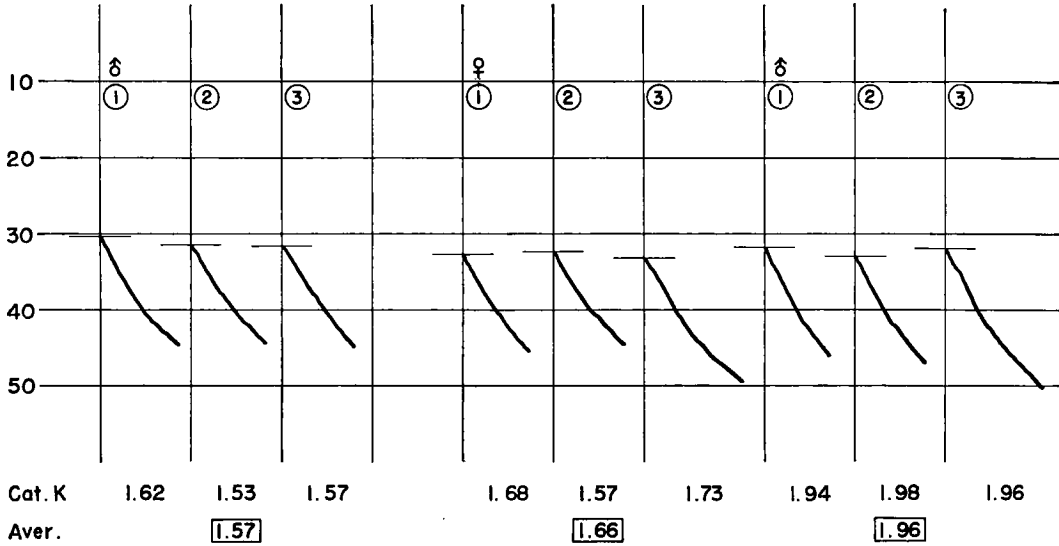
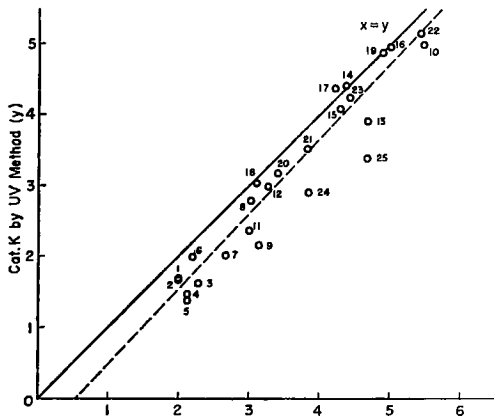


Fig. 4 滴定法ならびにUV法による血液カタラーゼ活性測定値の相関々係
 回帰方程式 $y = 1.05x - 0.56$



$Y = 0.78X - 0.01$

$Y = 1.05X - 0.56$

であつた。

IV. 総括並びに考按

本編に於いて著者は同一検体を滴定法および UV 法で比較測定するに際して、正確に同一温度 (37°C) の下に測定を行なつた。従つて両測定法は UV 法において H₂O₂ の濃度が滴定法の場合の 2.5 倍であること以外には同一条件下に行なわれた。両測定値を比較するに UV 法による正常者の各測定値は滴定法による値の約 90% の値を示し、UV 法としては前報

のその 80% より高い活性度を示した。

滴定法の場合 1 回の検査における 4 つの k cat 値について、一つ一つの測定値に対する標準偏差は 0.11 k cat 単位であるといわれている⁵⁾。

なお比較のため著者等の滴定法による測定成績より 10 例を任意抽出した場合、変異係数の平均値は 0.02 であつた。これを前述した UV 法による成績、正常人の変異係数 0.027、低「カ」血の変異係数 0.035 と比較すると変異係数は僅かに大であつた。従つて現在のところ正確さは UV 法は滴定法よりやや低いと比較的正確な方法といえるであろう。

Table 3 滴定法及び UV 法による測定成績の変異係数

	Sample Number	Normal	Hypo	
		Aver. of σ/M	Sample Number	Aver. of σ/M
Titration	10	0.020	—	—
U. V	5	0.027	5	0.035

V. 結 論

著者は恒温ならびに自記記録装置を装備して正常血 18 例、低「カ」血症血液 7 例について UV 法と滴定法を用いて血液カタラーゼ活性値を測定し以下の成績を得た。

1) 滴定法及び UV 法による測定値の相関係数は 0.96 であり、両者はよい相関を示した。

2) UV 法による測定値は正常人の場合滴定法のそ

れの平均 0.91, 低「カ」血症の場合 0.78 という値を示し両者の間に差のみられる点が注目された。

3) UV法の正確度を知るため同一標本の3回測定値に対する変異係数を求めると, 正常血及び低「カ」血症血液についてそれぞれ 0.027 及び 0.035 であつた。これは滴定法の場合に比して僅かに高いが, 測定成績の再現性は殆んど同じと考えられる。

4) 以上の成績より本UV法は人血液カタラーゼ活性値の測定法, 亦低「カ」血症のスクリーニング法

としての使用に充分堪えうるものと考えられる。

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。

擲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。

文 献

- 1) Chance, B, Maehly, A. C. : Assay of catalases and peroxidases. In Colowick & Kaplan (ed.) "Methods in Enzymology" 2, 64-773, Academic Press N. Y. 1955
- 2) Herbert, D., Pinsent, J.: Crystalline human erythrocyte catalase., Biochem. Jour. 43, 203, 1948
- 3) Orita, Y.: On the degradation of oxyhemoglo-

bin in acatalasemic hemolysate. Jap. J. Hum. Genet. 7, 4, 163-189. 1962

4) Takahara, S.: Acatalasemia. Jap. J. Hum. Genet. 7, 2, 37-56. 1962

5) 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 2. Measurement of human blood catalase activity by spectrophotometry with a temperature controlled cell chamber and autorecorder

By

Yoshito NAKAGAWA

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

Author's Abstract

For the spectrophotometry a Hitachi Perkin-Elmer 139 type spectrophotometer with a constant temperature cell chamber and autorecorder was used.

The measurements were conducted under the following conditions (final concentration of H_2O_2 0.0125 Mol in 0.01 Mol phosphate buffer, pH 6.8), which showed the identical conditions with a exception of H_2O_2 being 2.5 times the concentration employed in the titration method.

Both assays were carried out at 37°C.

The results by ultraviolet spectrophotometric method (UV method) were compared with those obtained by titration; the values obtained by UV method were about 90% of those by titration, and proved that each values showed a good correlation. Therefore this method will sufficiently serve for the measurement of human blood catalase activity or for the screening of hypocatalasemia.