

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

## 第 4 編

### 本法による活性の直接定量法と低「カ」血症のスクリーニング法

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

- |  |  |
|--|--|
| <p>I. 緒 言</p> <p>II. 実験方法</p> <p>III. 実験成績並びに考按</p> <p>1. UV法による人血液カタラーゼ活性の直接定量法と滴定法に対する換算</p> | <p>2. UV法による低「カ」血症のスクリーニング法とスクリーニングレベル</p> <p>3. Dr. Lange UV-Colorimeter の応用について</p> <p>IV. 総 括</p> <p>V. 結 論</p> |
|--|--|

#### I. 緒 言

第1編～第3編を通じてUV法による人血液カタラーゼ活性測定に関する基礎的研究を行なつたので、本編ではそれらを総合して定めた実験条件で実際に活性値の測定を行なつた。

そして本法による測定値と滴定法のそれとの間を換算式で表わした。

次に本法により低「カ」血症のスクリーニング法としての実験を行ない、その成績を他の方法と比較考察し、スクリーニングレベルを検討した。更に portable な UV-Colorimeter のスクリーニングに対する応用について研究を行なつたので報告する。

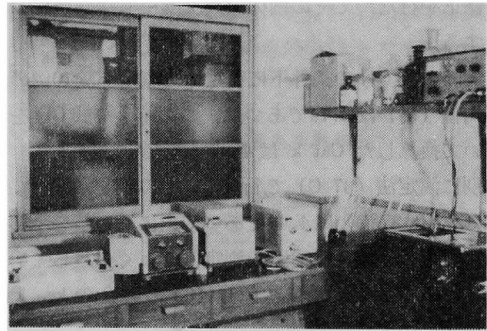
#### II. 実験方法

第1編及び第2編に述べたUV法による測定法を適宜使用した。Fig. 1 は本UV法測定実験における装置である。

#### III. 実験成績並びに考按

1. UV法による人血液カタラーゼ活性度より滴定法のそれへの換算について  
第1編、第2編に述べたように分光光度計による

Fig. 1 UV法測定実験装置



人血液カタラーゼ活性の測定方法には直読式の場合、自記記録装置を装着した場合、更に恒温装置を併用したことがある。それ以外に Beckmann 型を用いる場合も可能であり、これは基質が一定濃度に達する迄の時間を測定することによつて活性値を算出する。

現在のところでは従来の測定条件（滴定法、37°C）による測定値を基準にしているから、その値に換算しなす必要がある。換算方法は以下の如くである。即ち第1編に行なつた実験条件、即ち直読式分光光度計で室温（25°C）にて反応開始後30-90秒の値を用いた測定値  $k_1$  は第1編の Data を参考にして

\* 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

滴定法 (室温), 次いで 37°C の値, Cat k, tit. 37°C に換算する. 即ち室温における UV 法と滴定法との Cat k の比は 100 : 80 であり (第 1 編), 25°C と 37°C との Cat kuv は 100 : 90 である (第 3 編) ので

$$\text{Cat k tit. } 37^\circ\text{C} = k_1 \times \frac{100}{80} \times \frac{100}{90} = \frac{100}{72} k_1 \dots (1)$$

第 2 編の如き測定条件下, 即ち自記記録装置及び恒温装置を用い, 37°C で行なつた場合の測定値を  $k_2$  とすれば第 2 編の回帰方程式

$$Y_N : \text{正常人 Cat k tit. } 37^\circ\text{C}, X = \text{正常人 Cat kuv. } 37^\circ\text{C}$$

$$Y_N = 1.035 X - 0.513 \text{ を用いて}$$

$$\text{Cat k tit. } 37^\circ\text{C} = \frac{1}{1.035} (k_2 + 0.513) \dots (2)$$

同じく自記記録装置を装着し, 室温 (25°C) 下に測定した場合の値を  $k_3$  とすれば

$$k_3 = k_2 \times \frac{90}{100} \text{ として}$$

$$\text{Cat k tit. } 37^\circ\text{C} = \frac{1}{1.035} \left( \frac{100}{90} k_3 + 0.513 \right) \dots (3)$$

以上のようにして得た Cat k tit 37°C はその血液の Hb 値を測定し 14.0g/dl を 1 として Cat k 値の修正を行なつてその個体のカタラーゼ活性値  $K_{cat}$  とする.

実際に式 (3) の条件下に行なつた測定実験 10 例の平均値 ( $k_3$ ) は 3.74 であつた. この値より式 (3) を用いて換算した Cat k は 4.37 となる.

別に滴定法 (37°C) で行なつた 10 例の平均値, (Cat k tit. 37°C) は 4.44 であつて上に近い値を示した. それ故式 (3) は実際の測定例によく合致していることがわかる. なお式 (2), (3) の場合の  $k_2, k_3$

はまづ先述の尺度計 (第 2 編 Fig. 1) を用いて  $k$  値を求めると簡便である.

2. UV法による低「カ」血症のスクリーニング法とスクリーニングレベル

UV 法は人血液カタラーゼ活性の定量を行なうのであるから第 1 編, 或は第 2 編に述べた方法で活性値測定を行なつてもよいわけであるが, 現在のところ最も簡便な方法は自記記録装置を用いて室温下に測定する方法である.

Fig. 2 はこの方法で実際に行なつた低「カ」血症のスクリーニングテストの 1 部である.

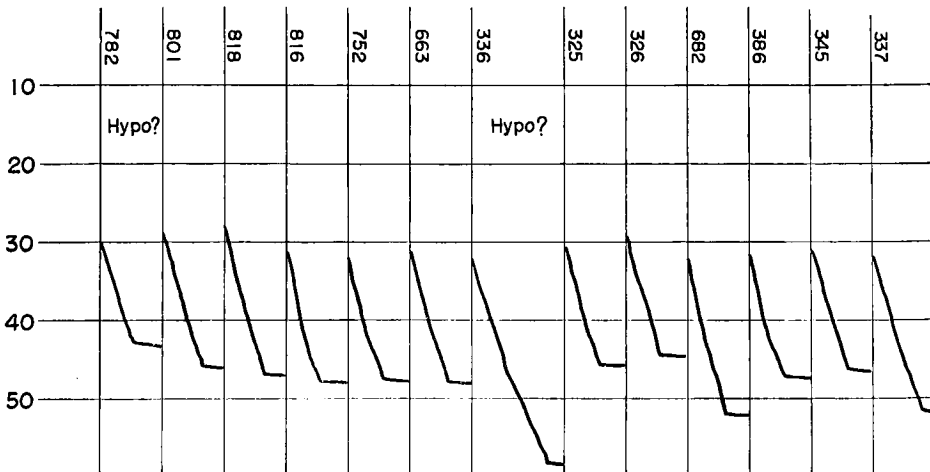
反応は 1 分を少し越す迄で正常血と低「カ」血との判別が可能であり, 疑わしいものは (第 2 編) の尺度計を用いて活性値を測定する. 尺度計にはスクリーニングレベル (Cat k = 2.4) に赤線で目印が付けてあり, その線より水平方向に傾くものを低「カ」血症の疑とする. 次に Hb 値を測定して活性の低い原因が貧血によるものでない場合には低「カ」血の疑いが強いので, 更に滴定法, 或いは UV 法によつて確かめる必要がある.

上記 UV 法によるスクリーニングレベルは以下の如くして算出する. 即ち kobara 法では滴定法の場合の実験条件 (但し室温) で反応 1 分に 2N-H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 約 2ml を加えて反応を止めた後 0.005N KMnO<sub>4</sub> 7ml を注入して呈色の有無で判別し紫紅色の残つた場合低「カ」血症の疑としているのでこの値の Cat k を  $k_s$  とすると

$$k_s = \frac{1}{60} \log \frac{10}{7} \quad \therefore k_s = 2.58 (25^\circ\text{C})$$

この値を 25°C の滴定値として, これを 37°C の

Fig. 2 低「カ」血症のスクリーニングテスト



値になをし更に式 (3) を応用して  $k_3$  を求めると、UV 法による  $k$  Screening Level<sub>1</sub> は

$$ku. SL_1 = 2.21 \quad (25^\circ C)$$

次に正常人血液カタラーゼ活性の平均値を  $M$ 、標準偏差を  $\sigma$  として  $M - 3\sigma = 3.19$  である<sup>7)</sup>。これを基準として UV 法のスクリーニングレベルを求めると式 (3) を用いて

$$ku. SL_2 = 2.51 \quad (25^\circ C)$$

この値では正常人をとりこみすぎて実際に用いる場合には高すぎるおそれがある。

従つて UV 法では低「カ」血症のスクリーニングレベルを 2.4 としておくが妥当であろう。

### 3. Dr. Lange UV-Colorimeter の応用について

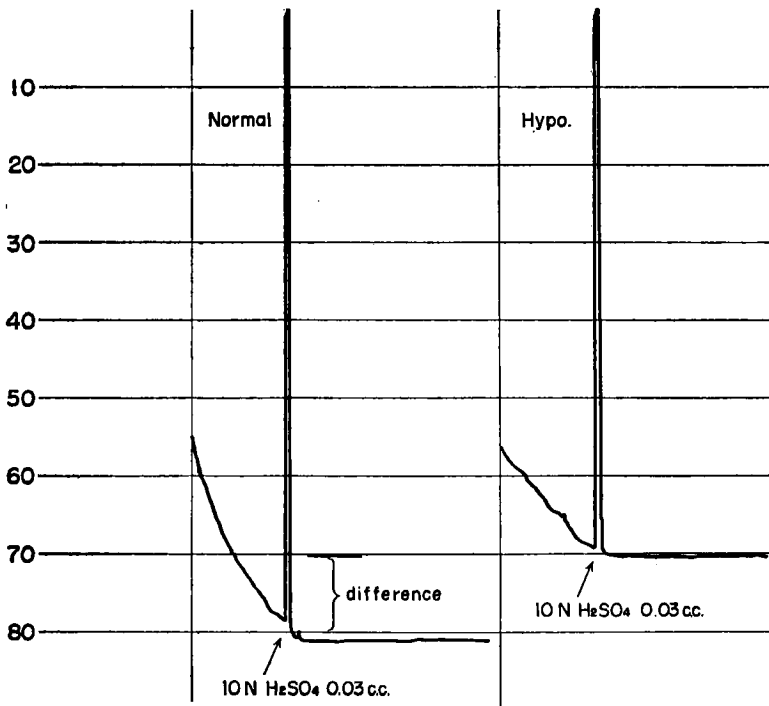
Dr. B. Lange の考案した UV-Colorimeter (紫外用比色計) は器械の機構は頗る簡単で portable である。その機構は石英硝子製低圧水銀灯からの光線が被検液を通つて黒色硝子と螢光板を有する光電池上に入射する。黒色硝子は水銀灯から出る可視線を吸収し、螢光層は紫外線を光電池の最高感度にある波長に変換し、光電流は増幅せず高感度の指示検流計で直読できる。それ故ほとんど純粹の単色光 (254  $m\mu$ ) で分析を行なうものである。著者は本器械の低「カ」血症のスクリーニング法への応用を試みたのでそれについて簡単に述べる。

実験材料および実験方法は既述の UV 法の場合と同様に行ない、第 2 編、式 (1) により  $k_{cat}$  を求めた。実験材料は同一検体を用いて更に UV 法および滴定法によつて測定を重ねた。

その測定成績は 1) 滴定法による測定値の  $k_{cat}$  は 4.316 (30 例平均, Hb 修正値), 4.070 (同じく Hb 未修正値であつた。2) 日立直読型分光光度計による波長 240  $m\mu$  を用いての測定値は 3.068 (10 例平均, Hb 未修正値) であつた。3) Lange UV-Colorimeter による測定値 (Cat  $k$ ) は 1.687 (10 例平均, Hb 未修正値) でかなり低い値であつた。これは計器の示針が反応時の状態を正確に示さず反応速度に遅れて動くものと考えられ、かつ測定成績は統計的処理により必づしも正確に比例的相関関係の下にないことがわかつた。従つて本器は前述の方法では人血液カタラーゼ活性測定には使用できない。そのため次のような方法を工夫した。

前述の条件下でのカタラーゼ反応において正常血と低「カ」血症とでは反応経過中に O. D. の差が最も大きくなる時間は 3 分である。従つて 3 分間反応を行なさせた時、高濃度の硫酸を少量注入し反応を止めて比色する方法である。Fig. 3 は正常血及び低「カ」血症について上述の実験を試みたものである。

Fig. 3 硫酸注入による正常血ならびに低「カ」血カタラーゼ反応停止実験例



この反応を停止させた *Cuvette* をそのまま用いて Hitachi 分光光度計及び Lange UV-meter によつて吸光度を測定した結果は Table 1 の如くよく一致した値を示している。従つてこの方法によれば Lange UV-meter を用いて低「カ」血症血液を正常血と確実に鑑別することが可能である。なお、その他の反応阻止剤については 254 m $\mu$  における吸収が著しいものは用いられない。硫酸による吸収は僅少であるが、この量が多いと反応液全体が薄まるので好ましくない。このようにして本器による人血液カタラーゼ活性の定量と低「カ」血症のスクリーニングとは多少煩雑であるが可能である。

Table 1 Hitachi および Lange UV-meter による吸光度の測定

	Hitachi	Lange
Normal	0.092	0.092
Hypo	0.152	0.163

#### IV. 総 括

低「カ」血症のスクリーニングの方法には採血した現地で行なう、Field survey と採血液を一旦搬送して行なう Laboratory system とがある。

又、スクリーニング法としては従来より行なわれてきた過マンガン酸カリ滴定法 (Kobara 氏法)、UV 法、Floating Disk method 及び Polarographic method<sup>7)</sup> が考案されている。

それぞれ特徴及び長短があるので一概には云えないが、技術的難易・器械器具薬品・運搬・測定時間及び能率・誤差、経費等についての条件を考慮して決められねばならない。

しかし総合的に考慮して Field survey としては一応従来の KMnO<sub>4</sub> を用いる所謂 Kobara 氏法が能率もよく最もよくすぐれた方法といえるようである。

UV 法は Laboratory system としてスクリーニン

グと同時に定量をも兼ね、技術的に単純で、特に熟練を要しない点が特徴である。

#### V. 結 論

人血液カタラーゼ活性を紫外部分光光度計を用いて測定する方法について検討を行なつた。

1) 従来の Euler-Josephson らによる滴定法の変法で測定した値 (Cat k t37) を基準として、本法でカタラーゼ活性値を測定した際、例えば第 2 編の測定条件で自記記録装置を装着し室温下に測定した値を Cat k u25 とすると換算方法は次式に示す如くである。

$$\text{Cat k t37} = \frac{1}{1.035} \left( \frac{100}{90} \text{Cat k u25} + 0.513 \right)$$

2) 本法は低「カ」血症のスクリーニング法としても応用しうる。その際特別の技術は不要であり、同時に定量をも兼ねる点の特徴である。室温 (25°C) におけるスクリーニングレベルとしては  $k=2.4$  とするのが妥当である。

3) Portable な Lange UV-Colorimeter をスクリーニング法に應用するには一旦 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> により反応を止めて後吸光度を測定する方法が有効であつた。

4) 本法は抽出カタラーゼ、或はその操作途中の不純カタラーゼの活性測定にも簡単に應用できる。

5) なお本法は人血液カタラーゼ酵素を更にその反応速度論的方面より研究する場合にも應用できるであろう。

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。

文 献

- 1) 川崎政美：岡山医学会誌, Vol. 71, No. 8-2, 5101, 1959
- 2) 小倉安之他：酵素化学シンポジウム 第3集, 11-13, 1949
- 3) Malcolm Dixon, Edwin C. Webb: "Enzyme", 54-63, 1964
- 4) 日本臨床 Vol. 22, No. 4, 2-17, 1964
- 5) Takahara, S., et al.: The catalase Protein of acatalasemic red blood cells. An electrophoretic and immunologic study. Lab. Invest. 11, 9 782-790 1962
- 6) Ogata, M., Takahara, S.: The catalase protein of acatalasemic and hypocatalasemic red blood cells. Acta Med. Okayama, 18, 11-14, 1964
- 7) 緒方正名：カタラーゼの測定, 無カタラーゼ血液症の遺伝学と生化学 医学のあゆみ, Vol. 54, No. 5, 297 医歯薬出版, 東京 1965

---

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

Part 4. A simple method of measuring human blood catalase activity and the screening test for hypocatalasemia

By

Yoshito NAKAGAWA

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

Author's Abstract

It is generally accepted that modified Euler-Josephson's method of titration gives the value of catalase activity, "Kcat" as the standard value. Whereas by the author's method taking the value of catalase activity as "k" measured, for example, at room temperature, recorded on an autorecording apparatus, it will be seen that we get the formula,  $Kcat = 1 / 1.035 (100/90K + 0.513)$

The present study has led to the following conclusions:

This method is characterized by the fact that it is useful for the screening test for hypocatalasemia as well as for simultaneous measurement of the catalase activity in human blood. It is suggested that the level of the screening be fixed more appropriately at 2.4.

Attempts have been made to use a portable UV-colorimeter to the screening but it seemed that this apparatus is not suitable for the purpose.

This method can measure not only the activity of purified catalase but also that of a partially purified catalase. It can also be applied for the measurement of catalase activity in tissues other than blood.

It is anticipated that this method can also be useful for the investigation of hypocatalasemic blood catalase from the aspect of enzyme kinetics.

---