

亜硝酸イオンによる正常およびアカタラセミアマウス 赤血球のメトヘモグロビン生成に関する試験管内 およびマウス投与実験

岡山大学医学部公衆衛生学教室（主任：緒方正名教授）

井 奥 尚 也

（昭和63年11月28日受稿）

Key words：亜硝酸イオン，カタラーゼ，メトヘモグロビン

著 言

工業化学物質や環境汚染物質によるメトヘモグロビン（以下、Met Hgb と略す。）血症について多くの研究が行なわれている¹⁾。また、我が国において近年は移動発生源による窒素酸化物（NO_x）の大気汚染が深刻化してきている。その中でNO_xの一つである二酸化窒素（NO₂）は水に溶解し硝酸と亜硝酸を生成するが、その亜硝酸が血液中のヘモグロビン（以下、Hgb と略す。）をMet Hgb に酸化することが知られている。前報^{2,3)}では、アカタラセミアマウスと正常マウスの溶血液に亜硝酸ソーダを添加し、両種マウスの溶血液中のMet Hgb 生成速度に差のあること²⁾、またトコフェロール類によりMet Hgb の生成が抑制されること³⁾を報告した。カタラーゼの研究は、カタラーゼを含まないHgb 溶液を精製し、亜硝酸によるHgb よりのMet Hgb 生成に対する実験系にカタラーゼを添加する事によって、その作用を研究する事も出来る。しかし、生体内に近い条件としては前報の如く、アカタラセミア溶血液を用いたカタラーゼの添加実験も考えられる。そして、より生体内に近い条件として種々の酸化酵素を含む赤血球の状態でのカタラーゼの影響を調べるには、アカタラセミアの赤血球でのみ可能である。

本報ではこれらの事実注目して、試験管内実験としては赤血球懸濁液に亜硝酸ソーダを添加し、その時のアカタラセミアマウスと正常マ

ウスのMet Hgb 生成量の差異およびグルコース添加による、グルタチオンペルオキシダーゼの影響について検討した。次いで、生体内実験としては両種マウスの腹腔内に亜硝酸ソーダを注射し、Met Hgb の生成量を測定した。そして、これらの結果を両種マウスのカタラーゼ活性度とともに比較検討した。

実 験 材 料

8～14週齢、体重28～41gの雄アカタラセミアマウス（C₃H/AnL Cs^b Cs^b）および雄正常マウス（C₃H/AnL Cs^a Cs^a）を用いた。

赤血球懸濁液は両種マウスの眼窩静脈より採血したものを用い、抗凝固剤としてヘパリンを使用した。

亜硝酸ソーダ（〔株〕和光純薬工業製）は血液と等張のリン酸緩衝液（pH7.0, 44mM）に溶解して用いた。

実 験 方 法

1. 赤血球懸濁液の作製

採血した血液は5分間、3,000rpm. で遠心分離し赤血球を得た。この赤血球を生理食塩水で3回洗浄した後、生理食塩水で元の量に戻した。これを用い後述の方法でMet Hgb 量、総Hgb 量、カタラーゼ活性度の測定をした後、生理食塩水リン酸緩衝液（pH7.0, 44mM リン酸緩衝液＋生理食塩水）を用いて3～5mg Hgb/mlの赤血球懸濁液に調整し、試料とした。

2. カタラーゼ活性度の測定

Feinsteinの過ホウ素酸法⁴⁾を用い20℃で、兩種マウス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法⁵⁾の改良法で測定し、Met Hgb量はHgb量に対する割合 (%) で示した。分光光度計は日立製 (100-60型) を使用した。

4. 赤血球懸濁液に亜硝酸ソーダを添加した時のMet Hgb生成

4-1) アカタラセミアおよび正常マウスの赤血球懸濁液に亜硝酸ソーダを添加した時のMet Hgb生成: 3 mg Hgb/mlに調整された兩種マウス赤血球懸濁液をそれぞれ37℃でincubateし、終濃度で1 mMとなるよう、亜硝酸ソーダを添加し、反応開始とする。以後5分間隔でMet Hgb生成量 (%) を測定した。この方法で兩種マウス数匹(アカタラセミアマウス:n=3, 正常マウス:n=4)について測定し、それらの赤血球中のMet Hgb生成量について有意差検定を行なった。また、亜硝酸ソーダの添加濃度に対するMet Hgb生成量については亜硝酸ソーダを終濃度で、250 μ M, 500 μ M, 1 mMとなるように添加して、30分後の正常およびアカタラセミアマウス赤血球中のMet Hgb生成量を測定しその結果を比較検討した。

4-2) アカタラセミアおよび正常マウスの赤血球懸濁液にグルコースを添加した時の亜硝酸ソーダによるMet Hgb生成: 兩種マウス各1匹より採血し、アカタラセミアマウス、正常マウスともそれぞれ終濃度で2 mMのグルコース(G)が添加された赤血球懸濁液(終濃度5 mg Hgb/ml)と同濃度のHgb量でグルコース無添加のものを調整した。これら(アカタラセミアマウス[G+], アカタラセミアマウス[G-], 正常マウス[G+], 正常マウス[G-])の4種類の赤血球懸濁液を同量とり、37℃でincubateしながら終濃度で1 mMの亜硝酸ソーダを加え、添加後10分間隔でそれぞれのMet Hgb生成量を測定した。これらの測定結果についてアカタラセミアおよび正常マウス、グルコース添加およ

び無添加のMet Hgb生成量を比較検討した。

5. アカタラセミアおよび正常マウスの腹腔内に亜硝酸ソーダを注射した時の兩種マウス血液中のMet Hgb生成

兩種マウスの体重、総Hgb量、Met Hgb量、カタラーゼ活性度を測定した後、体重1 gに対し50 μ gの亜硝酸ソーダを腹腔内に注射して40, 70, 100分後に採血し、兩種マウス血液中のMet Hgb生成量を測定した。この方法で兩種マウス各3匹ずつ測定し、兩種マウス血液中の各時間におけるMet Hgb生成量についての有意差検定を行なった。また、亜硝酸ソーダの注射量に対するMet Hgb生成量については、体重1 gに対して15, 30, 50 μ gの亜硝酸ソーダを腹腔内に注射し、40分後のアカタラセミアおよび正常マウス血液中のMet Hgb生成量を測定した。そしてこれらの結果を比較検討した。

実験成績

1-1. アカタラセミアおよび正常マウス赤血球懸濁液に亜硝酸ソーダを添加した際のMet Hgb生成

<Met Hgb生成量の経時変化>

図1は横軸が時間(分)縦軸がMet Hgb生成量 (%) で、兩種マウスの赤血球懸濁液に終濃度で1 mMの亜硝酸ソーダを添加した時のMet Hgb生成について5分間隔で30分まで経時的に測定し、平均値 \pm SEMで表示した。すべての時間において、アカタラセミアマウスのMet Hgb生成量の方が正常マウスのそれより多いことを認めた。

表1は、図1で示した測定値の平均値を表にし、アカタラセミアマウスと正常マウスのMet Hgb生成量について、それぞれの時間において有意差検定を行なったものである。10, 15, 20, 25, 30分の測定値において、5%の危険率で兩種マウスに有意差を認めた。

<Met Hgb生成量の亜硝酸濃度に対する変化>

図2は横軸が亜硝酸ソーダの濃度(μ M)縦軸がMet Hgb生成量 (%) で、兩種マウス赤血球懸濁液に亜硝酸ソーダを終濃度で250 μ M, 500 μ M, 1 mM添加し30分後、Met Hgb量を測定したものである。つまり兩種マウスにおいて、

亜硝酸ソーダの添加濃度と Met Hgb 生成量との関係を示している。両種マウスにおいても亜硝酸濃度の増加に対し Met Hgb 生成量は増加して

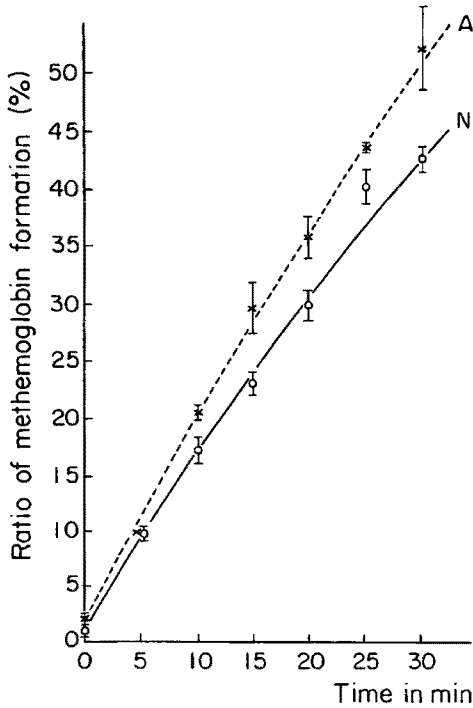


Fig. 1 Difference in methemoglobin formation by nitrite ion between normal (N) and acatalasemic (A) erythrocytes as time lapse.

いるが、いずれの濃度においてもアカタラセミアマウス Met Hgb 生成量の方が正常マウスのそれより多く認めた。有意差については、表 1 での 30 分値で示した。

1-2. アカタラセミアおよび正常マウスの赤血球懸濁液に亜硝酸ソーダを添加した際の Met Hgb 生成に対するグルコースの影響

図 3 の横軸は時間 (分) 縦軸は Met Hgb 生成量 (%) で、両種マウス赤血球懸濁液に亜硝酸

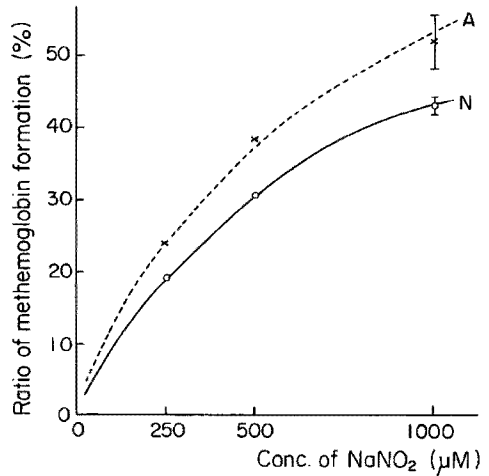


Fig. 2 Relationship between NaNO₂ concentration and methemoglobin formation in the erythrocytes of normal (N) and acatalasemic (A) mice at 30 minutes after adding NaNO₂.

Table 1 Difference in methemoglobin concentrations by nitrite ion between normal (N) and acatalasemic (A) erythrocytes as time lapse.

| mice | Time (min.) | 0 | 5 | 10 | 15 | 20 | 25 | 30 | Catalase (PU/g Hgb) |
|---|---|-------|--------|--------|--------|--------|--------|-------|---------------------|
| | Met Hgb (%) Erythrocytes-N-mice n=4 σ _{n-1} | 1.28 | 9.90 | 17.24 | 23.12 | 30.00 | 40.50 | 42.93 | |
| Met Hgb (%) Erythrocytes-A-mice n=3 σ _{n-1} | 1.96 | 10.04 | 20.52 | 29.72 | 35.96 | 43.75 | 52.35 | 82.8 | |
| Diff. (P<0.05) t=t-test W=welch | — | — | ○ W | ○ t | ○ t | ○ t | ○ W | | |

ソーダ (終濃度 1 mM) を添加した時にグルコース (終濃度 2 mM) が添加されているものと、無添加のものとを比較した図である。つまりグルコースを添加することによるグルタチオンペルオキシダーゼの影響を示している。10~40分においてアカタラセミアマウス、正常マウスとも、グルコースを添加したもののほうが無添加のものより Met Hgb 生成量が少なかった。しかしアカタラセミアマウスと正常マウスの Met Hgb 生成量の差は、同種マウスのグルコース添加と無添加の Met Hgb 生成量の差より大きかった。

2. アカタラセミアおよび正常マウスに亜硝酸ソーダを腹腔内注射した時の Met Hgb 生成

<Met Hgb 生成量の経時変化>

図 4 は横軸に時間 (分) 縦軸に Met Hgb 生成量 (%) を示し、亜硝酸ソーダの $50\mu\text{g/g}$ (体重) 注射時における Met Hgb 生成量と時間の関係についてアカタラセミアマウス、正常マウスとも数匹ずつ測定したもので、それぞれの測定値を平均値 \pm SEM で表示した。両種マウスとも亜硝酸ソーダ注射40分後に Met Hgb 生成量がほぼ最大になり、その後70、100分と徐々に減少してい

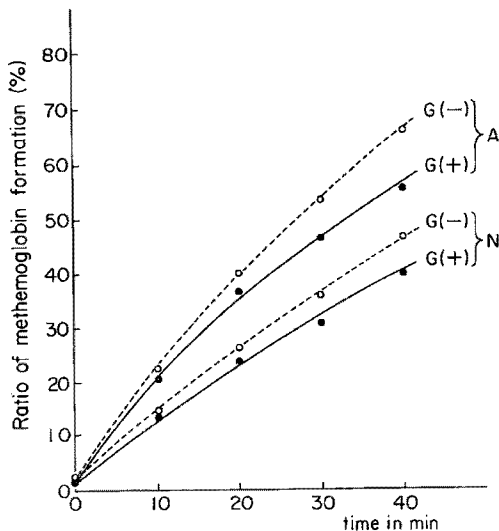


Fig. 3 Methemoglobin formation in the erythrocytes of normal (N) and acatalasemic (A) mice by nitrite ion as time lapse and the effect of glucose (G) on methemoglobin formation.

くが、いずれの時間においてもアカタラセミアマウスの Met Hgb 生成量の方が正常マウスのそれより多いことを認めた。

表 2 は、図 4 における測定値の平均値を表に示した。それぞれの時間におけるアカタラセミアマウスと正常マウスの Met Hgb 生成量について有意差検定を行なった。40分後と70分後については 5% の危険率で有意差を認めた。

<Met Hgb 生成量の亜硝酸注射量に対する変化>

図 5 (A, B) は横軸が時間 (分) 縦軸が Met Hgb 生成量 (%) で、マウス体重 1 g に対して 15, 35, $50\mu\text{g}$ の亜硝酸ソーダを腹腔内に注射した時の Met Hgb 生成量について、亜硝酸の注射量と Met Hgb 生成量との関係を示した。また、注射40, 70, 100分後の Met Hgb 生成量についてそれぞれ表示した。亜硝酸ソーダを $15\sim 50\mu\text{g/g}$ (体重) 注射時では両種とも40分後の Met Hgb 生成量が最大であった。

正常マウス (図 5 A) アカタラセミアマウス (図 5 B) とも亜硝酸ソーダの注射量が増加す

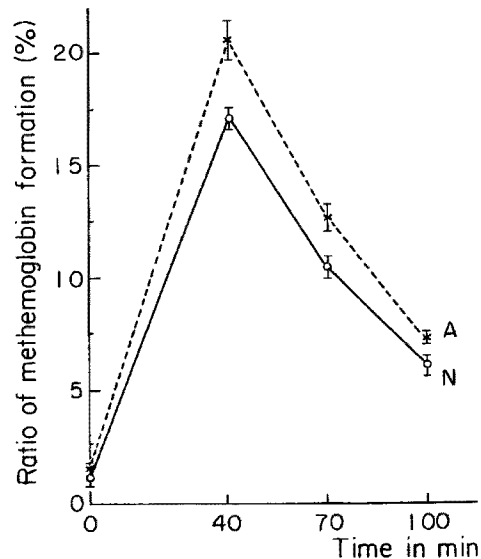


Fig. 4 Methemoglobin formation of normal (N) and acatalasemic (A) mice injected with NaNO_2 ($50\mu\text{g/g}$) as time lapse.

ると、40、70、100分後のMet Hgb生成量は増加した。そして、アカタラセミアマウス(図5 B)と正常マウス(図5 A)と比較するとアカタラセミアマウスの方が正常マウスより亜硝酸ソーダの注射量の増加に対するMet Hgb生成量の増加が大きいことを認めた。有意差については、表2における40分、70分値で示した。

考 察

前報²⁾の溶血液における亜硝酸ソーダによるMet Hgbの生成曲線と本報での亜硝酸ソーダに

よる赤血球中のMet Hgb生成曲線について比較検討すると、以下の如くである。

溶血液に亜硝酸ソーダを添加した際の時間に伴うMet Hgbの生成曲線はS字状の曲線を示した。そして、正常マウスとアカタラセミアマウスではMet Hgbの生成速度に差を認めた。また、亜硝酸ソーダの添加量が増加するとMet Hgbの生成速度も増加した。

次に赤血球懸濁液に亜硝酸ソーダを添加した場合では、Met Hgb生成曲線量は溶血液で認めたS字状の曲線は示さず、測定範囲内において

Table 2 Difference in methemoglobin concentrations between normal (N) and acatalasemic (A) mice at 40, 70, 100 minutes after injection of NaNO₂ (50μg/g) .

| mice | Time(min.) | 0 | 40 | 70 | 100 | Body Weight (g) | Catalase (PU/g Hgb) |
|------------------------------------|-------------------------|------|--------|--------|------|-----------------|---------------------|
| Met Hgb (%) N-mice | | 1.29 | 17.27 | 10.60 | 5.58 | 31.3 | 854 |
| | n=3 σ _{n-1} | 0.06 | 0.48 | 0.71 | 0.60 | | |
| Met Hgb (%) A-mice | | 1.60 | 20.54 | 12.79 | 6.52 | 34.7 | 58.4 |
| | n=3 σ _{n-1} | 0.43 | 1.60 | 1.12 | 0.23 | | |
| Diff. (P<0.05) t=t-test W=welch | | — | ○ W | ○ t | — | | |

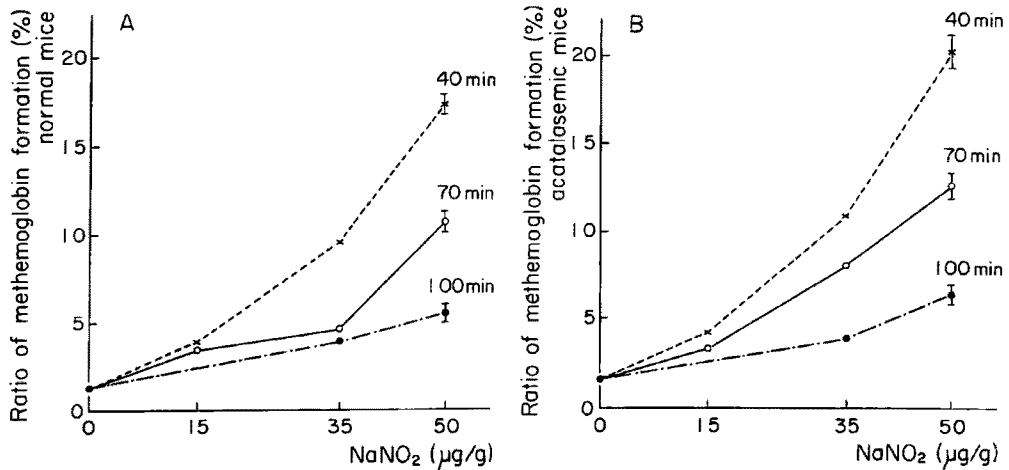


Fig. 5 (A, B) Dose effect relationship between amount of NaNO₂ and methemoglobin concentration of normal (A) or acatalasemic (B) mice at 40, 70, 100 minutes after injection of NaNO₂.

最初は直線的に増加し、後半 Met Hgb 生成量はやや頭打ちとなる対数曲線に似た曲線になった。そして、両種マウスを比較するとアカタラセミアマウスの Met Hgb 生成量の方が明らかに多く、亜硝酸添加後、10～30分では両者の Met Hgb 生成量に有意な差を認めた ($P < 0.05$)。また、亜硝酸ソーダ添加濃度と Met Hgb 生成量との関係を示すカーブは直線的ではなく、対数曲線に似た曲線であり、濃度の増加により Met Hgb 生成量も増加した。

本報では、正常およびアカタラセミアマウスの赤血球懸濁液にグルコースを添加することにより、亜硝酸ソーダを添加した際の Met Hgb 生成に対するグルタチオンペルオキシダーゼの影響について検討した。Ogata ら⁹⁾は、人赤血球の試験管内実験において無カタラーゼ血症患者の赤血球懸濁液を使用し、Azide およびグルコース添加有無の場合の過酸化水素による Met Hgb 生成について検討し、Met Hgb 生成の抑制は血液カタラーゼ活性度に強く依存していること、更にグルタチオンペルオキシダーゼも若干効果のあることが認められたと報告している。また、小林⁷⁾は正常およびアカタラセミアマウス赤血球懸濁液の過酸化水素暴露による Met Hgb 生成に対するグルコースの影響について検討し、グルタチオンペルオキシダーゼ作用下においてもアカタラセミアマウスの Met Hgb 生成量は正常マウスに比べて多かったと報告している。

グルコースの添加は赤血球内の NADPH を増加させ、グルタチオン還元酵素が作用して酸化型グルタチオンより還元型グルタチオンが生じ、グルタチオンペルオキシダーゼにより過酸化水素 (H_2O_2) を消失させる⁹⁾ことにより Met Hgb 生成を抑制する。

本報の実験でも、グルコース添加によって赤血球内に存在するグルタチオンペルオキシダーゼが作用したと考えられた。両種マウス赤血球懸濁液においてグルコースを添加したものより無添加のものの方が Met Hgb 生成量が多かった。しかし、アカタラセミアマウスの赤血球懸濁液にグルコースを添加したものは正常マウスのグルコース無添加のものより Met Hgb 生成量が多く、グルタチオンペルオキシダーゼ作用下にお

いてもカタラーゼ欠損の影響は補えないことを認めた。

以上の結果より赤血球レベルにおいて、正常およびアカタラセミアマウスの亜硝酸ソーダ添加による Met Hgb 生成については明らかにアカタラセミアマウスの方が大きいことから、カタラーゼの強い関与と若干のグルタチオンペルオキシダーゼの関与が推定された。

動物実験について考察すれば、以下の如くである。本報の実験においては、亜硝酸ソーダをマウスの腹腔内に注射した時、アカタラセミアマウスの方が正常マウスに比べ Met Hgb 生成量が多く、両者の Met Hgb 生成量に有意差を認めた ($P < 0.05$)。

スーパーオキシサイドアニオンによって赤血球内で Met Hgb 生成が起こる⁹⁾が、これは SOD と血液カタラーゼによって分解、抑制される。NODA¹⁰⁾は SOD 活性は正常マウス 1.95U/mg Hgb、アカタラセミアマウス 2.10U/mg Hgb で、アカタラセミアマウスの方が約 10% 高いことを報告している。

Met Hgb 還元機構において、Scott ら¹¹⁾は生成した Met Hgb に対する還元力の強さを比較し、その寄与の程度は NADH ジアフォラーゼ (73%)、アスコルビン酸 (12%)、還元型グルタチオン (9%) その他の還元酵素 (6%) と述べている。そして、小林⁷⁾は正常およびアカタラセミアマウスは正常時において、Met Hgb の還元に関与する NADH ジアホラーゼや、グルタチオンペルオキシダーゼの活性について両種マウスに有意差の無いことを述べた。また、平静時における血中の Met Hgb 量はすでにアカタラセミアマウスの方が高いことそして、Met Hgb 量はカタラーゼの活性度に依存していることを述べた。そして血液カタラーゼの欠損や低下は、血液中の Met Hgb 濃度の恒常性を乱し、Met Hgb 生成物質が作用しやすい状態を作っていると述べている。本報の実験結果でも、亜硝酸ソーダを両種マウスに作用させた際の Met Hgb 生成量は、アカタラセミアマウスの方が正常マウスより多く、この差は両種マウスのカタラーゼ活性度の差異によるものと考えられる。つまり、両種マウスには Met Hgb 還元機構の NADH ジアフォラーゼ

や、グルタチオンペルオキシダーゼの活性に有意差は無く、SOD 活性もアカタラセミアマウスの方がやや高いことから、亜硝酸ソーダによる Hgb の Met Hgb 化に対する抑制作用についてはカタラーゼが大きく関与していると考えられる。

結 論

正常およびアカタラセミアマウスの赤血球懸濁液に亜硝酸ソーダを添加した際の両種マウスの Met Hgb 生成量の差異、グルコース添加によるグルタチオンペルオキシダーゼの影響、そして両種マウスに亜硝酸ソーダの腹腔内注射をした時の Met Hgb 生成量の差異について、両種マウスのカタラーゼ活性度と共に比較検討し以下の結果を得た。

1. 正常およびアカタラセミアマウスの赤血球懸濁液（終濃度 3 mg Hgb/ml）に亜硝酸ソーダ（終濃度 1 mM）を添加し 5 分間隔で、Met Hgb 生成量を測定した時、アカタラセミアマウスは正常マウスより Met Hgb 生成量が多く 10, 15, 20, 25, 30 分値において両者に有意な差を認めた ($P < 0.05$)。

2. 正常およびアカタラセミアマウスの赤血球懸濁液（終濃度 5 mg Hgb/ml）に亜硝酸ソーダ（終濃度 1 mM）を添加した時の Met Hgb 生成量は、グルコース（終濃度 2 mM）添加時、無添加時、共にアカタラセミアマウスは正常マウスより多かった。また、両種マウスともグルコース添加時の Met Hgb 生成量は無添加時のものに比べて少なかった。

3. 正常およびアカタラセミアマウスに亜硝酸ソーダ（50 μ g/g 体重）を腹腔内注射した時の Met Hgb 生成量はアカタラセミアマウスは正常マウスより多く 40, 70 分値において両者に有意な差を認めた ($P < 0.05$)。

4. 以上の成績により亜硝酸ソーダによる Met Hgb 生成の抑制は血液カタラーゼの活性度に大きく依存していること、また、グルタチオンペルオキシダーゼも若干の抑制効果のあることを認めた。

稿を終るに臨み、御懇篤なる御指導と御高聞を賜った緒方正名教授に深甚なる謝意を表します。

（尚、本論文の要旨は第58回日本衛生学会総会において発表した。）

文 献

- 1) 渡辺 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，東京（1979）pp225—238.
- 2) 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容血液のメトヘモグロビン生成の差異について。岡山医誌（1987）99，843—849.
- 3) 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容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。岡山医誌（1987）99，851—862.
- 4) Feinsein RN：Perborate as substrate in a new assay of catalase. J Biol Chem（1947）180，1197—1202.
- 5) Van Assendelft OW：Spectrophotometry of Haemoglobin Derivatives. Royal Vangorcum Ltd. Assen Netherl（1970）
- 6) Ogata M, Takahisa T, Mizugaki J, and Takahara S：Glutathione peroxidase in the red cells of Japanese acatalasemic blood. J Human genet（1975）19，325—333.
- 7) 小林弘治：変異マウス血液中のカタラーゼ活性度とメトヘモグロビン濃度の関係，岡山医誌（1987）99，389—400.
- 8) 三輪史朗：溶血性貧血，遺伝生化学II，荻田善一編，中山書店，東京（1974）pp321—325.
- 9) Sutton H C, Roberts P B and Winterbourn C C：The rate of reaction of superoxide radical ion with oxyhaemoglobin and methaemoglobin. Biochem J（1976）155，503—510.

- 10) Noda Y, Narumiya S, Takai K and Hayaishi O : Superoxide dismutase activity in acatalasemic erythrocytes ; in Biochemical and Medical Aspects of Active Oxygen Hayashi and Asada eds, University of Tokyo press, Japan (1977) pp293—297.
- 11) Scott E M, Duncan I W and Ekstrand V : Reduction of methemoglobin. Fed Proc (1963) 22, 467.

**Methemoglobin formation from hemoglobin by nitrite ion
in the erythrocytes of normal and acatalasemic mice ;
in vivo and *in vitro* study**

Naoya IOKU

Department of Public Health,

Okayama University, Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. M. Ogata)

The formation of methemoglobin from hemoglobin by nitrite ion in the erythrocytes of normal and acatalasemic mice and that in the erythrocytes of both mice injected with nitrite ion were studied. The formation of methemoglobin from hemoglobin by nitrite ion in red cells with or without the addition of glucose *in vitro* was also studied.

Methemoglobin concentration in red cells of acatalasemic mice after the addition of NaNO_2 was higher than that in red cells of normal mice. The addition of glucose inhibited the formation of methemoglobin from hemoglobin by nitrite ion.

Methemoglobin concentration in the blood of mice injected with NaNO_2 (15~50 $\mu\text{g/g}$) was determined. The results indicated that methemoglobin concentration in the blood of acatalasemic mice is higher than that in the blood of normal mice. These results indicated that the formation of methemoglobin from hemoglobin by nitrite ion appears to be controlled by the activity of blood catalase.