

アカタラセミアマウスの血液および 肝臓カタラーゼ活性の熱安定性

第 1 編

フェニルヒドラジン投与時の アカタラセミアマウス血液カタラーゼ活性の熱安定性

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

小 柏 道 子

(平成元年9月8日)

Key words: アカタラセミアマウス, フェニルヒドラジン, カタラーゼ, 熱安定性

結 言

アカタラセミアは, 1947年高原¹⁾によって初めて報告された血液中にカタラーゼ活性が極めて低い (正常人のその約0.1%²⁾) 体質異常者である. その約半数は進行性顎骨壊疽症を有する.

日本人アカタラセミアの残余カタラーゼの熱に対する安定性は正常人と同じであり, 且つ網状赤血球 (網赤血球) と成熟赤血球のカタラーゼ活性度は等しく分布していることが緒方らにより報告³⁾されている.

その後, スイス人のアカタラセミアが, 1961年, Aebi⁴⁾によって報告された. そして, スイス人アカタラセミアの成因については, Aebi の報告⁵⁾がある. すなわち, スイス人アカタラセミアの血液カタラーゼは, 正常人の血液カタラーゼに比べて熱, 尿素に感受性が高く, 網状赤血球において特に活性が高い事実を述べている. そのことから, スイス人アカタラセミアの血液カタラーゼは, 構造上に変化があり, 成熟に伴う活性度の減少が強いと考えられた.

また, 1964年, Feinstein によって X 線照射マウスの中に見いだされたアカタラセミアのマウスの血液カタラーゼも, 正常マウスのそれに比べて, 熱及び尿素に対する感受性が高かった⁶⁾. そしてマウスの瀉血処理で貧血を起こさせ, 網状赤血球を増加させた場合の赤血球中のカタ

ラーゼ活性も, アカタラセミアマウスが正常マウスよりも熱および水素イオン濃度に対する感受性が高かった⁷⁾. したがって, マウスにおいてもスイス人と同様に, 構造に変化のあるカタラーゼが成熟とともに活性度が減少すると考えられた.

以上の点から, マウスのアカタラセミアの網状赤血球中のカタラーゼにおいても, アカタラセミアの熱に対する感受性が成熟赤血球と異なるか否か, また, 正常マウスとアカタラセミアマウスの血液カタラーゼの熱に対する感受性が網状赤血球と成熟赤血球の間で異なるか否かが問題となった.

そこで, アカタラセミアマウスにフェニルヒドラジン注射法を用いて, 網状赤血球の多く含まれている貧血血液をつくり, その中のカタラーゼの熱安定性を成熟赤血球を多く含む非投与群血液のそれと比較したので, その成績をここに報告する.

実験材料および実験方法

1. 実験動物

マウスは, 純系の C₃HAnL (♂) のうち, ①正常マウス: C₅^aC₅^a, ②アカタラセミアマウス: C₅^bC₅^b, ③ヒポカタラセミアマウス: C₅^aC₅^b (正常♀マウスとアカタラセミア♂マウスとのかけ合わせおよび正常♂マウスとアカタラセミア♀

マウスとのかけ合わせによって生まれた異型接合体)の3種類を使用した。そして、各々の種類のマウスについて、フェニルヒドラジン投与群と非投与群に分けて、生後2~11月齢で体重が24~40gのものを4~6個体ずつ実験に用いた。

2. 試料調製

正常、アカタラセミアおよびヒポカタラセミアの3種のマウスに、pHを7~7.4に調整した1% phenylhydrazine hydrochloride (PHZ)水溶液を1日1回として3日間連続皮下注射した。1回の注射量は40 μ g/gBWとした。そして、注射後2日経過後に、マウスの眼窩静脈より採った血液に蒸留水を加えて適宜希釈した溶血液を酵素液として実験に用いた。

3. カタラーゼ活性の測定

過硼素酸ナトリウムを基質とし、過マンガン酸カリ溶液を用いて滴定する松原, Aebi⁸⁾の方法に準じた。酵素液として用いた溶血液の希釈倍数は、正常マウス血液は250倍、アカタラセミアマウス血液は10倍、ヒポカタラセミアマウス血液は100倍とした。カタラーゼ活性度はヘモグロビンあたりのカタラーゼ活性 (PU/gHb) で表した。

4. 網状赤血球数の計測

検査法は、赤血球の染色にニューメチレン青を用いる Brecher 法⁹⁾に従い、さらに染まり具合をよくするために、Giemsa 液による後染色を行

った。網状赤血球数は、光学顕微鏡を用いて15 \times 100倍で検鏡して、1000個の赤血球中に含まれる網状赤血球数を計測し、網状赤血球数/赤血球数 \times 100 (%) で表した。

5. ヘモグロビンの定量

D. L. Drabkin¹⁰⁾のシアンメトヘモグロビン法により発色させ、540nmで吸光度を測定して、血液中のヘモグロビン量 (g/dl) を算出した。

6. 熱安定性

正常、アカタラセミアおよびヒポカタラセミアマウスの血液を蒸留水で適宜希釈して溶血液にした。上述のものと同一酵素液を用いて熱処理を行った。42~50 $^{\circ}$ Cの間に2 $^{\circ}$ C間隔でふ置温度を設け、溶血液を各温度で10分間恒温水槽中に放置後、残存するカタラーゼ活性を測定した。そして、未処理の血液のカタラーゼ活性を100%として、熱処理後に残余するカタラーゼ活性を比較した。なお、カタラーゼ活性度の差異の検定は、t検定または Welch の検定法によった。

実 験 成 績

1. PHZ 注射による血液カタラーゼ活性と網状赤血球数の変動

Table 1は、正常、アカタラセミアおよびヒポカタラセミアの3種のマウスについて、PHZ投与および非投与の血液カタラーゼ活性 (PU/ml), Hb濃度 (g/dl) 及びカタラーゼの比活性度 (PU/g Hb) を示したものである。3種類の

Table 1 Catalase activity in the blood of normal, hypocatalasemic and acatalasemic mice after administration of phenylhydrazine hydrochloride, subcutaneously.

| | Normal | | Hypocatalasemia | | Acatalasemia | |
|----------------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|------------------|
| | Control (n=5) | PHZ n=5) | Control (n=5) | PHZ (n=6) | Control (n=5) | PHZ n=4) |
| Blood catalase (PU/ml) | 107.7 \pm 2.1 | 44.1 \pm 3.0 | 59.0 \pm 0.7 | 46.7 \pm 1.6 | 4.4 \pm 0.1 | 7.3 \pm 0.3 |
| Hemoglobin (g/dl) | 13.2 \pm 0.4 | 4.9 \pm 0.4 | 14.1 \pm 0.2 | 7.1 \pm 0.2 | 11.8 \pm 0.3 | 5.9 \pm 0.6 |
| Blood catalase (PU/gHb) | 819.6 \pm 36.4 | 909.6 \pm 15.2 | 417.9 \pm 8.9 | 655.4 \pm 13.0 | 37.3 \pm 1.0 | 126.4 \pm 12.6 |

Data are expressed as mean \pm standard error.
PHZ: Phenylhydrazine hydrochloride.

* p<0.05 ** p<0.005
PU: perborate unit.

マウスは、いずれも PHZ 投与により溶血性貧血を起こし、その結果、Hb は約1/2以下の有意 ($p < 0.005$) の減少を示した。また、PHZ 投与によって網状赤血球の著明な増加が認められた。

血液中のカタラーゼ活性度は、正常及びヒポカタラセミアマウスにおいては、いずれも有意 ($p < 0.005$) に減少した。正常マウスでは、PHZ 投与群は非投与群に対して0.4倍を示し、ヒポカタラセミアマウスでは、PHZ 投与群は非投与群に対して0.8倍を示しており、前者は後者よりも減少の程度が高い。一方、アカタラセミアマウスでは、PHZ 投与群は非投与群に比べてカタラーゼ活性は著しく増加 (1.7倍) し、両者に有意 ($p < 0.005$) の差が認められた。

血液カタラーゼの比活性度 (PU/gHb) は、正常マウスにおいては、PHZ 投与群が非投与群に対して1.1倍の増加のみで、両者に有意の差は認められなかった。ヒポカタラセミアマウスにおいては、PHZ 投与群の比活性度が非投与群のその1.6倍に増加し、両者に有意 ($p < 0.005$) の差が認められた。アカタラセミアマウスにおいては、PHZ 投与群血液カタラーゼの比活性度の増加は最も著しく、非投与群のそれに対して3.4倍に増加し、両者に有意 ($p < 0.05$) の差を

生じた。したがって、PHZ 投与による非投与群に対する血液カタラーゼ活性の増加率は、アカタラセミアマウス、ヒポカタラセミアマウス、正常マウスの順に高いことが認められた。

2. PHZ 投与時の血液カタラーゼの熱安定性

1) マウスの血液カタラーゼ活性の熱安定性について、PHZ 投与群と非投与群との比較

Fig. 1 は、PHZ 投与群と非投与群のマウスの溶血液に対して、42°Cから50°Cまでの温度について、2°C間隔の5段階温度で10分間の熱処理を行った時のカタラーゼ活性を、マウスの種類別に比較したものである。図において、PHZ 投与群マウスは実線で、非投与群マウスは破線で示しており、x 軸は加温温度を示し、y 軸はカタラーゼの残留活性度を示している。これより、正常マウスとアカタラセミアマウスでは、42~50°Cのすべての温度において、投与群マウスのカタラーゼが非投与群マウスのそれより熱安定性が高かった。ヒポカタラセミアマウスでは、46°C以上では投与群マウスのカタラーゼが非投与群マウスのそれより熱安定性が高くなっていった。したがって、PHZ 投与群血液のカタラーゼ活性の熱安定性は3種のマウスのいずれにおいても、

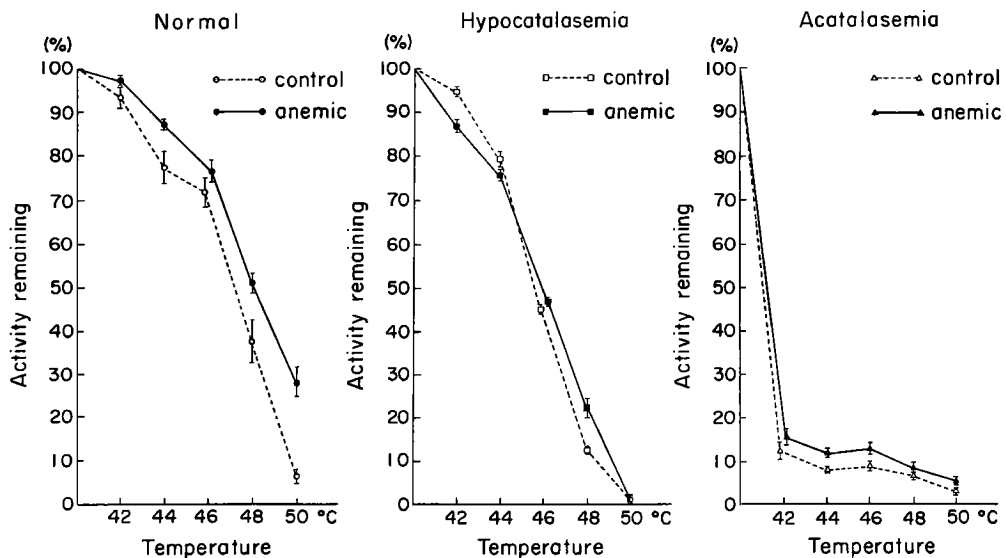


Fig. 1 Heat inactivation of catalase in the anemic and non-anemic bloods of 3 kinds of mice (difference in catalase between anemic and non-anemic bloods of 3 kinds of mice).

非投与群血液のそれより高い傾向が認められた。

2) 3種のマウス間における血液カタラーゼ活性の熱安定性の比較

Fig. 2は、マウスの血液カタラーゼ活性の熱安定性について、PHZ投与群と非投与群に分けて、3種のマウス間の差を比較したものである。この図からわかるように、血液カタラーゼ活性の熱安定性はPHZ投与群、非投与群のいずれにおいても、アカタラセミア、ヒポカタラセミア、正常マウスの順に低かった。

3) T_{50} 及び $T_{12.5}$ における差の検定

PHZ投与による血液カタラーゼの熱に対する安定性を、一定量の活性が残留する温度で比較した。すなわち、正常及びヒポカタラセミアマウスでは、熱処理後のカタラーゼ活性の50%残留温度(T_{50})を求め、ヒポカタラセミアマウス及びアカタラセミアマウスでは、熱処理後のカタラーゼ活性の12.5%残留温度を求めて、Table 2に示した。まず、3種のマウス別にPHZ投与

群と非投与群の間の差を比較すると、正常マウスの T_{50} は、PHZ投与群は48.1℃であり、非投与群は47.3℃であって、PHZ投与群が非投与群より有意($p < 0.05$)に高かった。ヒポカタラセミアマウスは、 T_{50} と比較すると、PHZ投与群、非投与群ともに45.8℃で、両者の間に有意の差は認められなかったが、 $T_{12.5}$ で比較すると、PHZ投与群は48.9℃であり、非投与群は48.1℃で、PHZ投与群が非投与群より有意に($p < 0.005$)に高かった。アカタラセミアマウスは、 $T_{12.5}$ で比較すると、PHZ投与群は45.9℃であり、非投与群は43.0℃であって、PHZ投与群が非投与群より高かったが、有意の差は認められなかった。

次に、PHZ投与群と非投与群とに分けて、3種のマウス間の差をみると、以下のようであった。 T_{50} は、PHZ投与群及び非投与群のいずれにおいても、正常マウスがヒポカタラセミアマウスより有意($p < 0.005$)に高かった。また、 $T_{12.5}$ は、非投与群において、アカタラセミアマ

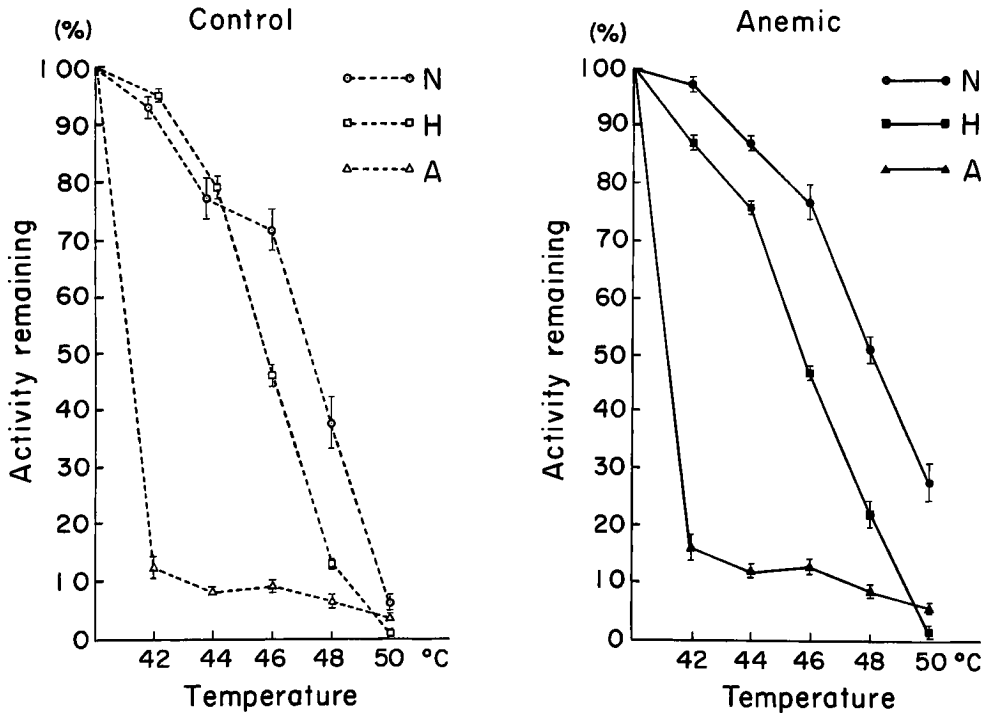


Fig. 2 Heat inactivation of catalase in the anemic and non-anemic bloods of 3 kinds of mice (difference in catalase among normal, hypocatalasemia and acatalasemia).
 N : normal mice, H : hypocatalasemic mice, A : acatalasemic mice

Table 2 Thermal stabilities of normal, hypocatalasemic and acatalasemic mice.

| Strain | | T ₅₀ (°C) | T _{12.5} (°C) |
|-----------------|---------------|----------------------|------------------------|
| Normal | Control (n=5) | 47.3±0.1 | 48.1±0.1 |
| | PHZ (n=5) | 48.1±0.2 | |
| Hypocatalasemia | Control (n=5) | 45.8±0.1 | 48.9±0.1 |
| | PHZ (n=6) | 45.8±0.1 | |
| Acatlasemia | Control (n=5) | | 43.0±0.2 |
| | PHZ (n=4) | | 45.9±1.1 |

T₅₀ or T_{12.5}: temperatures, showing 50% and 12.5% of catalase activities remained after heat treatment for 10 minutes, respectively.

Data are expressed as mean±standard error.

p<0.05 ** p<0.005

PHZ: phenylhydrazine hydrochloride.

ウスがヒポカタラセミアマウスよりも有意(p<0.005)に低かった。

考 察

アカタラセミアマウスの残余カタラーゼは、放射線によって生成され、またスイス人のアカタラセミアと同じように、網状赤血球に多く、且つ熱安定性が正常マウスのカタラーゼより低いことから、残余カタラーゼの構造の変異が推定されている。

本研究の結果、アカタラセミアマウスの網状赤血球のカタラーゼの熱安定性が成熟赤血球のカタラーゼのそれより高いことは、成熟赤血球がさらに崩壊しやすい状態にあることを示すと思われる。

アカタラセミアマウスについて、現在までの知見は、成熟赤血球中の残余カタラーゼに熱安定性が低い⁶⁾こと及び網状赤血球のカタラーゼ活性が高い⁷⁾ことである。今回の報告では、網状赤血球の熱安定性が高いことが明らかとなった。すなわち、アカタラセミアマウスの血液の残余カタラーゼは、生成した時にすでにカタラーゼに変異があると考えられる。一方、網状赤血球中のカタラーゼ活性が成熟赤血球中のカタラーゼ活性より熱安定性が高いことについては、以下の事実が関係あると思われる。すなわち、成熟赤血球のカタラーゼに比べて、網状赤血球のカタラーゼは DEAE カラムで ABC fraction に分

けた場合に、網状赤血球では A、成熟赤血球では C fraction が多いといえることができる結果を Thorup¹¹⁾は報告している。この点から考えると、カタラーゼの成分は、網状赤血球と成熟赤血球とは異なると考えられる。Thorup は成熟に従うカタラーゼの SH 残基の減少を推定している。あるいは、C fraction の熱安定性が A fraction より悪いかもしれない。この点は、今後の研究により明かにしたいと考えている。

結 論

正常、アカタラセミアおよびヒポカタラセミア (異型接合体) の 3 種のマウスに、1 回投与量として 40μg/gBW の phenylhydrazine hydrochloride (PHZ) を、1 日 1 回で 3 日間皮下注射して貧血を起こさせた。そして、最終注射の 2 日後に眼窩静脈から採った血液について調べた。また、血液カタラーゼ活性の熱安定性は、42°C から 50°C までについて、2°C 間隔で 10 分間加熱処理後のカタラーゼ活性を測定した。そして、次のような成績が得られた。

1. PHZ 投与により、血液カタラーゼの比活性は、正常、ヒポカタラセミアおよびアカタラセミアの 3 種のマウスのいずれにおいても、非投与群に比べて増加し、アカタラセミアマウスとヒポカタラセミアマウスでは有意の差が認められた。そして、PHZ 投与群の非投与群に対する血液カタラーゼ比活性の増加率は、

アカタラセミア, ヒポカタラセミア, 正常マウスの順に高かった。

2. 網状赤血球を多く含有する PHZ 投与群のマウス血液のカタラーゼ活性の熱に対する安定性を, 非投与群のそれと比較するために, 正常およびヒポカタラセミアマウスにおいては加熱後の活性が50%残留する温度 (T_{50}), アカタラセミアおよびヒポカタラセミアマウスにおいては加熱後の活性が12.5%残留する温度 ($T_{12.5}$) で比した。その結果, 正常マウスでは T_{50} において, ヒポカタラセミアマウスでは $T_{12.5}$ において, PHZ 投与群が非投与群より有意に低いことより, 正常およびヒポカタラセミアマウスの PHZ 投与群血液のカタラーゼ活性の熱安定性はいずれも, 非投与群血液のそれより高いことが認められた。
3. 正常マウスの血液は, PHZ 投与群, 非投与群のいずれにおいても, ヒポカタラセミアマ

ウスの血液より T_{50} が有意に高かった。また, アカタラセミアマウス血液は PHZ 投与群, 非投与群のいずれにおいてもヒポカタラセミアマウス血液よりも $T_{12.5}$ が低く, 非投与群では有意差が認められた。これより, 血液カタラーゼの熱安定性は, PHZ 投与群, 非投与群のいずれにおいても, アカタラセミア, ヒポカタラセミア, 正常マウスの順に低いといえる。以上の成績から, フェニルヒドラジン投与により誘導された網状赤血球中のカタラーゼは, 成熟赤血球中のカタラーゼと種族差については差がないことが推定された。

稿を終えるに臨み, 懇篤なるご指導, ご校閲を賜りました緒方正名教授に深甚なる謝意を表します。

なお, 本論文の要旨は, 日本人類遺伝学会第31回大会 (昭和61年11月, 東京) において発表した。

文 献

- 1) Takahara S : Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood. *Lancet* (1952) 2, 1101—1104.
- 2) Ogata M, Sadamoto M and Takahara S : On the minimal catalatic activity in Japanese acatalasemic blood. *Proc Jpn Acad* (1966) 42, 828—832.
- 3) Ogata M, Tomokuni K, Watanabe S, Osaki H, Sadamoto M, Takahara S : Residual catalase in the blood of Japanese acatalasemia Tohoku. *J Exp Med* (1972) 107, 105—114.
- 4) Aebi H, Heiniger JP, Butler R and Hassig H : Two cases of acatalasemia in Switzerland. *Experientia* (1961) 17, 466.
- 5) Aebi H, Cantzt M : *Humangenetik* (1967) 4, 29.
- 6) Feinstein RN, Howard JB, and Savol R : Heat and urea stability of blood catalase of mutant mouse strains. *Experientia* (1971) 27, 1152—1153.
- 7) Ogata M, Inoue T, Tomokuni K, Takahara S : Catalase activity of immature and mature red cells from acatalasemic mouse mutant. *Acta Haematol* (1970) 44, 11—20.
- 8) Matsubara S, Suter H, Aebi H : Fractionation of erythrocyte catalase from normal, hypocatalatic and acatalatic humans. *Humangenetik* (1967) 4, 29—41.
- 9) 日野志郎 : 網状赤血球算定法について — とくに Brecher 法. *臨病理* (1961) 9, 332—335.
- 10) Drabkin DL : Spectrophotometric studies. XTV. The crystallographic and optical properties of the hemoglobin of man in comparison with those of other species. *J Biol Chem* (1946) 164, 703—723.
- 11) Thorup OA, Carpenter JT, Howard P : Human erythrocyte catalase : Demonstration of heterogeneity and relationship to erythrocyte aging in vivo. *Br J Haematol* (1964) 10, 542—550.

Heat stability of catalase activity in the blood and liver of acatalasemic mice

Part 1. Heat stability of catalase activity after administration of phenylhydrazine hydrochloride subcutaneously

Michiko KOGASHIWA

Department of Public Health,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. M. Ogata)

In order to investigate the heat stability of catalase in immature and mature erythrocytes of normal, acatalasemic and heterozygous hypocatalasemic mice, phenylhydrazine hydrochloride (PHZ) was administered to these mice at a dose of 40 $\mu\text{g/g}$ of body weight subcutaneously daily for 3 days. Anemic blood rich in reticulocytes was obtained 2 days after final injection. Thermostability of catalase in the non-anemic and anemic bloods was compared and the following results were obtained.

1. Specific catalase activity (catalase activity/amount of hemoglobin ; PU/g Hb) in anemic blood from acatalasemic mice was significantly higher than that in non-anemic blood. Specific catalase activity in anemic blood from normal mice was a little higher than that in non-anemic blood from normal mice.

2. The residual catalase activity in the hemolysate after heat treatment was compared with that from before treatment in which hemolysate containing catalase was incubated at 42, 44, 46, 48 and 50 °C for 10 minutes in a water bath. At any temperature, catalase activity in immature red blood cells of normal and acatalasemic mice was more stable with heat than that in immature red blood cells.

3. In normal mice, the T_{50} (the temperature at which 50 % of the catalase activity remained after heat treatment) in anemic normal blood was statistically higher than that in non-anemic blood. In the acatalasemic mice, the $T_{12.5}$ (the temperature at which 12.5 % of the catalase activity remained after heat treatment) in anemic blood was statistically higher than that in non-anemic blood.