

BULLETIN OF THE NATIONAL  
INSTITUTE OF  
INDUSTRIAL HEALTH

No. 7

Supplement 1

1962

労働衛生研究所研究報告

第七号

補冊

昭和三十七年

THE NATIONAL INSTITUTE  
OF INDUSTRIAL HEALTH

MINISTRY OF LABOUR

労働省労働衛生研究所

労働省労働衛生研究所

川崎市木月住吉町2051

編 集 部

編集主任者 山 口 正 義

編 集 者 坂 部 弘 之

小 池 重 夫

## はじめに

労働衛生の主要な目的は、有害な労働環境を排除して、労働者の健康な生活と労働とを保証することにある。労働者の健康を評価するには種々の方法があるが、血液の性状の変化からその健康状態を推定する方法は古くから使われ、現在も最も有力な武器として使用されている。いうまでもなく体内に侵入した有害物質はまづ血中に入り血液の各種成分にその影響を及ぼす場合が少なく、又一方血液は諸臓器の障害の情報を伝えるものである。血液成分のうちで最も重要な役割、すなわち体内における酸素及び炭酸ガスの運搬の任務をもつ赤血球の変化は、それがたとえ微少なりとはいえ、生体の機能に大きく影響するものと考えられるし、又血中に侵入した有害物質の影響をつよくこうむる可能性が考えられる。吾々は労働者から採取した貴重な血液については、その血液の伝える一切の情報をもれなく汲み取って、労働者の健康を正しく評価し、たとえその変化が僅かであつても、そのような変化をひき起した労働環境に対して鋭い注目を払わなければならない。

赤血球、ことにその重要な成分であるヘモグロビンが、各種有害物によりこうむる障害については、ここ数年労働衛生学者の手によつて、精力的に開発されて来たが、ここに一般生化学の分野においてヘモグロビンについて深い造詣をもたれている研究者と、共通の討論の場が得られるならば産業中毒における、ヘモグロビンの諸変化に対する吾々の認識は更に深められ、且つ上げられることが出来るであろうと考え当研究所の開所5週年記念行事の一つとして、この討論を計画したわけである。

1962年6月9日

労働衛生研究所職業病部長

坂 部 弘 之

# 1. 正常時とベンゼン中毒時の 骨髄デオキシリボ核酸の比較

木村正己 (労働衛生研究所)

ついてその化学構造的相異を追究した。

## 実験方法

材料とした動物臓器：屠殺直後凍結24時間保存した仔牛胸腺。家兎（メス）10数匹の上腕骨、大腿骨および脛骨より摘出し凍結保存した骨髄。ベンゼン（等量の胡麻油と混合した溶液）0.2ml および 1.0ml/体重1kg を皮下注射により1週間投与した家兎（メス）10数匹より同様にして摘出し凍結保存した骨髄。

DNA の調製：凍結組織より塩化カルシウム含有蔗糖溶液を用いる Mirsky<sup>2)</sup> 法により細胞核を単離した。凍結単離核からドデシル硫酸ナトリウムを用いる Dounce<sup>3)</sup> 法で DNA-Na 塩標品を調製した。

磷の定量：Allen<sup>4)</sup> 法を適用した。

窒素の定量：分解触媒として水銀を用いるケールダール法を適用した。

紫外吸収測定：DNA-Na 塩水溶液（pH5.6, 14°C）の紫外吸収を Cary 分光光度計により測定した。

塩基組成の分析：DNA-Na 塩標品3～5mg を炭酸ガス封入の状態で2～3ml の6N塩酸により100°C, 3時間加水分解した。乾固した加水分解物についてDowex-1 (Cl型) 12.5×0.6cm のカラムを用い、イオン交換クロマトグラフにより各塩基を分別定量した<sup>7)</sup>。溶離液は0.025M, 0.1M および 0.5M 塩化アンモニウム (0.2M アンモニア含有), pH10.6, 10.1 および 10.0, 段階的溶出を行い、各溶出区分 (10ml) の波長 260m $\mu$  における吸光度を測定し、シトシン、チミン、グアニンおよびアデニンを定量した。溶出各区分について塩類をできるだけ除去後、メタノール：濃塩酸：水 (70:20:10V/V/V<sup>8)</sup>) および n-ブタノール：ギ酸：水 (75:15:10V/V/V<sup>9)</sup>) の系により一次元ペーパークロマトグラフを行って各塩基を確認した。

メチルグリーン・ピロニン染色法：DNA-Na 塩、その加水分解物および RNA 標品などについて、その少量をスライド板上にとり、水2～3滴を加えて板上でよく攪拌し、ゲル状にして直径1～2cm のスポットを作成した。骨髄組織の場合にはアルコール固定後パラフィン包埋し薄片したものを使用した。この標本に対しメチルグリーン・ピロニン染色試薬 (2%ピロニン5ml+2%メチルグリーン3ml+0.1M 醋酸塩緩衝液, pH4.82, 12ml) で30～40分染色し、その後 n-ブタノール, n-ブタノール・キシロール (1:1V/V) 次いでキシロールにて洗浄した。

## 結果および考察

DNA 調製の材料とした臓器の湿重量と標品乾燥重量は表1に記載した。特に家兎の場合には体重および白血球数の前値と当値を併記したが、ベンゼン中毒にかかったことは体重および白血球の減少から認められ、骨髄組織からのDNAの収量も低下した。各DNAの磷および窒素含量と窒素/磷 (重量比) 値を表2に記載した。両含量とも文献値と比較して低い傾向を示したが、この原因は標品中に食塩が混入したか、或は用いた分析法に問題があるのかもしれない。しかし同一調製法と測定法によつて異なることを考慮すれば、中毒時の家兎骨髄DNAは正常時のものと比べ、磷および窒素含量低いと結論できる。窒素/磷の値は仔牛胸腺DNAの場合には文献値に近いが、家兎骨髄の場合には正常時でも中毒時でも高い値を与えた。胸腺以外の臓器から調製したDNAの窒素/磷値は高い傾向があることが知られている。その原因の一つとして窒素含有物質の夾雑が考えられる。表記号BIIのDNAにおいてその加水分解物から数種のアミノ酸が確認された。標品中の蛋白部分の除去が不十分なのかもしれない。この推定の裏づけとしてDNA水溶液の紫外吸収曲線において290m $\mu$  附近に「かた」が認められた。各DNA標品の紫外吸収特性を表3にまとめた。家兎骨髄DNAの吸収極大、極少波長, Emax/Emin. および  $\epsilon$  (P) については正常時でも中毒時でも同じであった。従つて紫外吸収特性から中毒時と正常時の骨髄DNAについて差異を見出せない。夾雑物の影響、例えばアミノ酸の存在などを無視しうる比較法として塩基組成分析を行ったが、その結果を表4に文献値と一緒に記載した。標準試料とした仔牛胸腺デオキシリボ核酸の場合に文献値と差異が認められ、また骨髄の場合も家兎とネズミでは差異があった。調製法や分析法、さらに種属の相異などを考慮すればこの差異はやむを得ないだろう。従つて、同一種属器官において同一の調製法と分析法を用いて、正常時と中毒時の差異を比較するならば意義があろう。さらにクロマトグラフによる4塩基の回収率は家兎骨髄の場合85%に相当するからこの比較は信頼しうる。中毒時家兎骨髄DNAの塩基組成は正常時のものと比べてグアニンが増加し、チミンが減少した。アデニンおよびシトシンについては明かな増減がなかった。従つて、表中に示した(G+T)/(A+G)が一定で、(G+C)/A+Tが中毒時のものでは増加した。正常時家兎骨髄DNAは仔牛胸腺DNAと同様にメチルグリーン・ピロニン染色で緑

色の染色性を示したにも拘らず、中毒時家兎骨髓 DNA は紫紺→赤桃色を呈し、仔牛胸腺 DNA の穏和な酸加水分解物と類似した。この染色性の相異の原因は DNA の解重合によると考えてもよいのではないか。また、骨髓組織標本において正常時の場合と中毒時の場合を比べると、この染色性の変動が骨髓細胞核においても認められることは中毒時において細胞核内で DNA が構造的に変化していると推論できよう。紫外線照射でもカエルの骨髓細胞核のメチルグリーン染色性が変わるといった結果が報告<sup>12)</sup> されている。

ベンゼン中毒により骨髓 DNA 量は組織重量あたり明かに減少し、その DNA は正常時のものと比べ、燐および窒素含有量の低下、塩基組成においてグアニンの増加とチミンの減少が認められた。また、メチルグリーン・ピロニンの染色性の相異が明かとなった。X線照射の場合、チミジンの DNA へのとり込みの低下<sup>13)</sup> とか、プリン系塩基<sup>14)</sup> が分解されるとか、粘度が低下する<sup>15)</sup> とか幾多の構造上の変化を示唆する知見が報告されている。放射線障害とベンゼン中毒において細胞分裂毒としてその類似性が認知されている<sup>16,17)</sup> が、その中毒時骨髓 DNA にも構造上に変化が認められた。

- 1) Oka, M. and Kimura, M.: Bull. Nat. Inst. Indust. Health, 5, 1, (1961).
- 2) Allfrey, V. G., Mirsky, A. E. and Osawa, S.: J. Gen. Physiol., 40, 451, (1957).
- 3) Kay, E. R. M., Simmons, N. S., Dounce, A. L.,: J. Am. Chem. Soc., 74, 1724, (1952).
- 4) Allen, R. J. L.: Biochem. J., 34, 858, (1940).
- 5) Hiller, A., Plazin, J. and Van Slyke, D. D.,: J. Biol. Chem., 176, 1401, (1948).
- 6) Wyatt, G. R.: Biochem. J., 48, 584, (1951).
- 7) Cohen, W. E.: Science, 109, 377, (1949).
- 8) Kirby, K. S.: Biochim. Biophys. Acta., 18, 575, (1955).
- 9) Markham, R. and Smith, J. D.: Biochim. J., 45, 294, (1954).
- 10) Marks, A. M. and Butler, G. C.: J. Biol. Chem. 190, 165, (1951).
- 11) Chargaff, E. and Davidson, J. N.: "The Nucleic Acid," Vol. 1. 335P., (1955).
- 12) Errera, M.: Biochim. Biophys. Acta, 17, 605, (1951).
- 13) Mitchell, F. R. S.,: "The Cell Nucleus", 57P., (1960).
- 14) Hems, G.: Nature, 181, 1761, (1958).
- 15) Butter, J. A. V. and Smith, K. A.: J. Chem. Soc., 3411, (1950).
- 16) Biesele, J. J.: Mitotic Poison and Cancer Problem, (1958).
- 17) Koike, S., Kawai, K. and Sugimoto, H.: Bull. Nat. Inst. Indust. Health, 2, 1, (1959).
- 18) Marshak, A and Vogel, H. J.: J. Biol. Chem., 189, 597, (1951).

図 1. デオキシリボ核酸ナトリウム塩水溶液の紫外吸収曲線

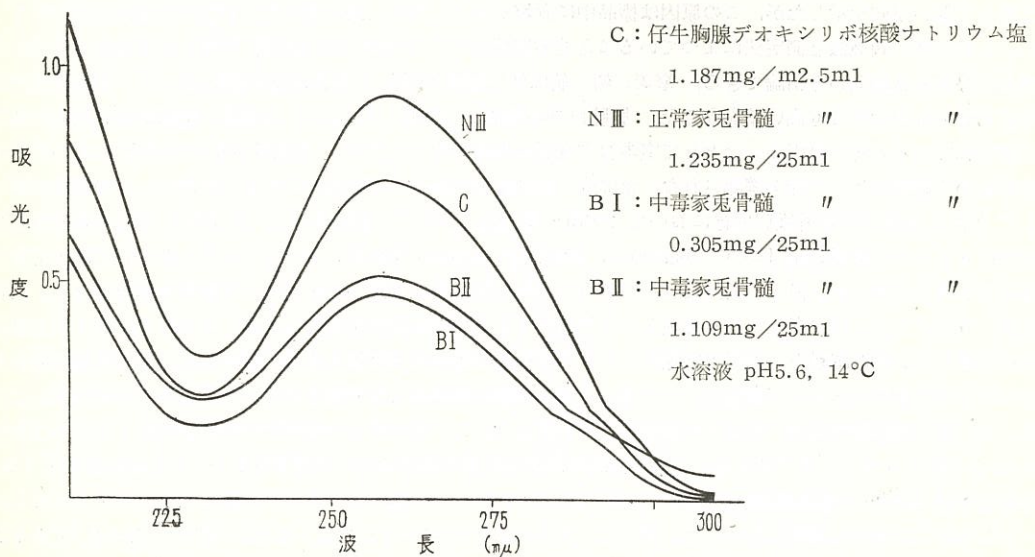


表 1 家兔骨髓と仔牛胸腺よりデオキシリボ核酸ナトリウム塩の調製

実験記号	種属器官	投与条件 ※※※ ベンゼン	動物匹数	体 重※ (Kg)		白血球数※※※ ×10 <sup>3</sup>		材料臓器 湿重量 (g)	DNA-Na 標 品 (mg)	※※ 平均数量 (mg)/(g)
				前 値	当 値	前 値	当 値			
				N I	家 兔	—	1			
N II	—	1	2.1	2.1		12.8	14.2	4.8	25	
N III	—	5	—	1.8		—	10.8	22	65	
N IV	—	15	—	2.0		—	10.6	65	159	
SB I	骨	0.2	1	2.0	1.5	11.2	2.1	5.7	11	} 2.1
SB II		0.2	1	1.9	1.4	10.1	7.1	6.3	14	
B I	髓	1.0	17	—	1.6	10.4	1.3	95	12	} 1.4
B II		1.0	29	2.3	2.2	10.7	4.1	190	685	
B III		1.0	1	1.7	1.8	10.0	5.1	7.2	2	
B IV		1.0	1	2.0	1.8	11.0	6.0	4.8	9	
C	仔牛胸腺	—	※ ½	—	—	—	—	75	189	25

※ 材料家兔数匹の場合は平値で示す。

※※ 材料臓器湿重量 (g) あたりのデオキシリボ核酸量 (mg)

※※※ 投与ベンゼン (ml)/家兔体重 (Kg)

表 2 デオキシリボ核酸ナトリウム塩の磷および窒素含量

実験記号	種属器官	磷 含 量 (%)	含 量 平均値(%)	窒 素 含 量 (%)	含 量 平均値(%)	窒素 / 磷
C	正常仔牛胸腺	7.50		11.0		1.5
N I	正 常 家 髓 兔 骨 髓	6.47	} 6.75	11.3	} 11.45	1.7
N II		6.27		11.4		1.8
N III		6.96		12.1		1.7
N IV		7.29		11.0		1.5
SB I	中 毒 家 髓 兔 骨 髓	6.09	} 6.01	—	} 11.1	—
SB II		5.03		11.1		1.9
B I	中 毒 家 髓 兔 骨 髓	5.85	} 5.85	—	} 10.5	—
B II		5.03		10.2		2.0
B III		6.30		10.0		1.6
B IV		6.20		11.2		1.8

表 3 デオキシリボ核酸ナトリウム塩水溶液の紫外吸収

実験記号	吸収極少波長 (m $\mu$ )	吸収極大波長 (m $\mu$ )	E <sub>max</sub> /E <sub>min</sub>	$\epsilon$ (P)
C	231	258	3.3	6,800
N I	231	258	2.7	8,000
N II	231	258	2.8	8,400
N III	231	258	2.9	8,300
SB I	230	258	2.3	
SB II	231	258	2.1	8,300
B I	231	258	2.65	8,200
B II	231	258	2.9	
B III	231	258	2.6	8,850
B IV	231	258	2.7	8,400

表 4 デオキシリボ核酸ナトリウム塩の塩基組成

種 属 器 官	P. 1g 原子量当りの塩基のモル数				※ X-成分 百分率 (%)	全 回収率 (%)	プリン ピリミジン	G+T A+C	G+C A+T	文 献
	グアニソ (G)	アデニン (A)	シトシン (C)	チミン (T)						
仔牛胸腺	20.8	29.2	20.8	29.2		96				(3)
仔牛胸腺 C	18.4	29.7	21.8	33.8	4.9	101	0.87	1.01	0.63	
ネズミ骨髄	21.4	28.6	20.4	28.4						(18)
正常家兎骨髄 N III	20.5	31.3	20.5	30.3	6.2	92	1.01	0.99	0.68	
	20.6	30.6	20.5	30.2						
中毒家兎骨髄 B II	22.5	29.9	20.8	26.6	6.3	91	1.10	0.97	0.77	
中毒家兎骨髄 B I	26.4	31.6	18.3	23.4	9.3	94	1.39	1.00	0.81	

※ Dowex-1 カラムクロマトグラフにおいて最終溶離液 0.5M NH<sub>4</sub>Cl (0.2M NH<sub>4</sub>OH 含有) にて溶出される区分の全試料に対する割合 (260m $\mu$  における吸光度として), X-成分は n-BuOH: HCOOH: H<sub>2</sub>O (75:15:10V/V/V) による一次元ペーパークロマトグラフにおいて R<sub>f</sub> 値は原点より0.06まで, 加水分解物に微量のグアニンおよびチミンが確認された。

## 2. ポルフィリン代謝—特に鉛

### 中毒を中心に—

佐野晴洋

(京都大学医学部公衆衛生学教室)

私のポルフィリン及び最近のチトクロームC合成の研究は、最初は鉛中毒の代謝という産業医学的な興味より開始されたものであり、現在でもこの方面の研究がより深く進められている。

私が鉛中毒の四大徴候(鉛着白、好塩基斑点赤血球、コプロポルフィリン尿、鉛緑)の中、特に好塩基斑点赤血球について研究を開始したのは1952年のことだった。間もなくこの好塩基点はリボ核酸(RNA)を含むことを細胞化学的にも生化学的にも証明した。(日血誌:18,625, 1955)。私の研究がここ迄終っていたならば恐らくその後の発展はなかったであろう。すなわち何かこの赤血球が網赤血球と比べて異なる点があるに違いない。顆粒の形成が既に生体内で生じているか否かを調べたい。それには位相差顕微鏡でみればよいと考えた。色々苦心した1954年10月のある日、遂にこの赤血球からミトコンドリアを発見した。(日血誌:18,631, 1955)。今でこそ幼若赤血球がミトコンドリアを含むことは周知の事実として知られているが、当時は非常に大きな発見として、京大天野重安先生、西尾教授より激励され、又外国での反響が大きかった。

私はこの残存しているミトコンドリアに著しく興味を持ち、一体何の役目をしているのであろうかと考えてみた。RNAが血色素の蛋白合成つまりグロビン合成に関与すると考えるなら、ミトコンドリアではポルフィリン或はヘムが出来るかと誠に好都合だ。鉛中毒のもう一つの重要な症状であるコプロポルフィリン尿と云うのもこう云った所から本質的に解明されて行くのではないかと予想した。これが私の現在の研究のいとぐちであった。1956年になってブルジルのValleio-Freireの教授から、電頭で網赤血球よりミトコンドリアを発見したと云う手紙と数葉の電頭写真が私に送られて来た。1957年に妹尾教授から意外にも網赤血球よりミトコンドリアを確認したとの私信を得、益々私の自信は深まった。

ポルフィリンと云えば誰もあの複雑な構造式を思い浮べ基だしく取っつきにくい感がするであろう。事実やればやる程むづかしく、生化学と云うよりむしろ有機化学的な色彩の濃い学問領域である。Hans Fischerの仕事は勿論のこと、1946年以來のShemin一派のアイソトープを用いたポルフィリン合成の輝かしい業績とか、英国のRimington, Neuberger 両教授の仕事をもみて大体そのことが判るであろう。我が国ではチトクローム系の研究では世界的な学者が少なくないのに不思議にポルフィリンを専攻する研究者は殆どなかった。英米での終戦後のこの方面の研究が素晴らしく早く開発され、そこに食いこむ余地がなかったのもその理由の一つである。私は考えた。諸外国に対抗する為には彼等のあまりやらない細胞学的な面からやると、血液学者とか生化学者の興味の対象とはなっていない工業鉛中毒を新しい見から地つけば何か知見が出るに違いないと考えた。幸に私は1958年春、血液学会宿題報告を担当し、ポルフィリン及びヘム合成におけるミトコンドリアの役割と題しての研究結果を発表することが出来た。(日血誌:21,337, 1958) それ迄はポルフィリンが赤芽球のどこで出来るかと云うことについては不明であった。

Watson一派がcongenital Porhysia の患者の骨髓標本の螢光顕微鏡的観察により核にポルフィリン螢光を強く証明し、従って核でポルフィリンが合成されるとの印象を強く与えた。その後紺野(生化学:26,260, 1954)、中尾(日血誌:20,1, 1957)により赤芽球核合成説が出たが、私達の研究で否定された。

Shemin の用いた雞赤血球は有核なるが故に用いられた彼の着想は実は核膜の周辺部に存在するミトコンドリアがその主なポルフィリン合成酵素を持っておったことも私達の研究により明かにされた。(日血誌:21,337, 1958, Science:129,275, 1959, 細胞化学シンポジウム:8,191, 1958に詳述) 即ち私達はポルフィリン代謝の中、三つの過程においてミトコンドリアが重要な役割を演ずることを明かにした。第一の過程はGlycineより $\delta$ -Aminolevulinic Acidの形成、第二の過程はProtoporphyrin生成、第三は鉄導入即ちヘム合成の過程にあることを報告した。その後私はRockefeller 研究所に行き、第二の過程について詳細な生化学的研究を試み、ミトコンドリアがCoproporphyrinogenを酸化脱炭酸せしめProtoporphyrinを生成することを明かにした。(J. Biol. Chem.:236,1173, 1961) 次に現在迄に明かになったポルフィリン合成の過程は次の如く三大別され、ヘム合成を含めて四大別される。

- 1) Glycine  $\rightarrow$   $\delta$ -Aminolevulinic Acid ( $\delta$ -ALA Synthetase)
- 2)  $\delta$ -ALA  $\rightarrow$  coproporphyrinogen III
- 3) Coproporphyrinogen III  $\rightarrow$  Protoporphyrin IX (Coproporphyrinogen Oxidase)
- 4) Protoporphyrin IX  $\rightarrow$  heme

個々の系路はFig.1.に図示されている。即ポルフィリンの最初( $\delta$ -ALA-Synthetase)と最後の酵素(Coproporphyrinogen Oxidase, 鉄導入酵素)は何れもミトコンドリア中に集中され、中間の酵素群( $\delta$ -ALA  $\rightarrow$  Coproporphyrinogen III)は細胞質のsoluble Fractionに存在しており、ミトコンドリアとは無関係とされている。



Table 1 には赤血球系, 肝系についてポルフィリン合成酵素の所在と活性を比較表示した。

さて鉛中毒の場合のポルフィリン代謝はどうであろうか。それは単に鉛がポルフィリン環への鉄導入を抑制する (Rimington) と云った様な簡単なものではないことを主張する必要がある。私は先に鉛投与マウス72時間後の骨髓赤芽球のミトコンドリアの末端に著明なる空胞変性を認め、またミトコンドリアを含む好塩基斑点赤血球 (この中にも空胞あり) を多数証明した。即ち  $\delta$ -ALA Synthetase としてのミトコンドリアが存在すると云うこと、基質としての Glycine の赤芽球及び好塩基斑点赤血球中の増加 (角谷, 国民衛生:28, 617, 1959) が、鉛中毒の  $\delta$ -ALA 合成の一因である。事実我々は好塩基斑点赤血球及び尿中より多量の  $\delta$ -ALA を証明した。この  $\delta$ -ALA は中毒の急性期は勿論、慢性時にも著しい高値を示すのが特長である。次の中間物質である Porphobilinogen (PBG) は中毒の急性期には  $\delta$ -ALA の消長に極めてよく平行するが、中毒の慢性化につれ漸次その量が  $\delta$ -ALA に比べて減少の度が強くなる。恐らく  $\delta$ -ALA-Dehydrase の活性 ( $\delta$ -ALA $\rightarrow$ PBGの酵素) が低下する為と考えられる。本酵素の活性を慢性鉛中毒家兎の種々の臓器について教室の小池が測定した結果、骨髓細胞においてその活性の減少を見た。(国民衛生:28, 601, 1959)。田辺は Ca-EDTA を鉛中毒家兎に投与すれば、尿中に増量していた  $\delta$ -ALA が忽ち減少し、反対に PBG が著明に増加する興味ある実験事実を発見、鉛による  $\delta$ -ALA Dehydrase の抑制が EDTA により除去されたことを実証した。(国民衛生:28:560, 1959) 次に PBG が polymerize して Uroporphyrinogen が生成されるが、鉛中毒の時には殆んど尿中に増加しない。Rolymerase の障害があるのか、或は PBG の  $\beta$ -位置の醋酸がメチルに脱炭酸され、その後 polymerize して Coproporphyrinogen になる可能性も考えられるので現在研究中である。次の Coproporphyrinogen の増加は周知の事実であり、その増加は注射後2日目に骨髓細胞、赤血球、血漿に速かに認められ、尿中に排泄される。(井上, 国民衛生:28, 180, 1959) 漸次慢性化につれ低下の傾向を示すが、尚正常値より高値を示し、この時期には血液中に好塩基斑点赤血球の増加と Protoporphyrin の増量をみる (ミトコンドリアの為、Coproporphyrinogen $\rightarrow$ Protoに転換)。従って Protoporphyrin の増加する大部分の原因は Coproporphyrinogen 量に対する充分量のミトコンドリアー oxidase の存在を意味する。

次に Protoporphyrin への鉄の Incorporation の実験であるが、 $\delta$ -ALA を基質にし、雞赤血球溶血液を用いて Uro, Copro, Proto を生成せしめ、これにミトコンドリアと共に二価鉄 ( $2 \times 10^{-4}M$ ) を加えて incubate すると Protoporphyrin が減少しへムが生成される。この系に醋酸鉛 ( $2 \times 10^{-4}M$ ) を添加してもへム生成の障害は殆ど認められなかった。(角谷, 国民衛生:28, 627, 1959) 又実際の鉛中毒患者で血中の Protoporphyrin が極めて多く増加しているにも拘らず末梢血液像として、好塩基斑点赤血球の増加を認めたのみで、貧血、血色素低下等が認められない例がかなりの高率に存在していたこと、また鉛投与家兎に Vit B<sub>12</sub> (10 $\gamma$ )、葉酸 (15mg) を同時に30日間注射すると、貧血及び血色素量の低下が防がれたが血中遊離 Protoporphyrin は薬剤投与群と非投与群との間に差を認めなかった。このことは鉛中毒の時にポルフィリンが過剰に合成されるメカニズムになっていること、Fe の Incorporation が鉛によりたいして障害を受けないこと (VitB<sub>12</sub>, 葉酸は鉄の導入には関与せず) を示しておく。鉛中毒による骨髓リボ核酸の減少を VB<sub>12</sub> が正常に回復せしめる為、血色素量の回復を見る (原田, 国民衛生:25, 122, 1956) のであり、従って鉛中毒による貧血は Globin 合成異常の為ではなからうか? 鉛が porphyrin ring への鉄導入を阻害すると云う実験は種々報告されているが、この種の実験では鉛による沈澱が生じ、何か非酵素的な別な障害が起きた可能性がある。(例えば Porphyrin の Solubility の減少等)。筆者の鉛中毒のポルフィリン合成過剰説を立証する為 Glycine, ALA, PBG を慢性鉛中毒家兎の骨髓及び末梢血と共に incubate し、この際形成されるポルフィリンを分別定量した。骨髓を材料にした場合、鉛中毒時には Glycine よりの Protoporphyrin 合成能は極めて高く、 $\delta$ -ALA, PBG からの場合も正常家兎群より高値を示した。末梢血を材料にした場合は好塩基斑点赤血球が多数出現し、Glycine よりの Protoporphyrin 合成能が極めて高く、又  $\delta$ -AL, PBG からも高い合成能を示した。即ち骨髓及び末梢血において Glycine,  $\delta$ -ALA, PBG からの合成能が特に高く、その中 Glycine からは最も高い合成能を示している。(井上, 国民衛生:28, 189, 1959) 鉛中毒のポルフィリン代謝の全貌 Fig.2. に要約した。即ち鉛中毒時においてポルフィリン代謝の第一の代謝異常は Glycine から  $\delta$ -AL 合成能亢進にあると考える。 $\delta$ -AL Dehydrase の障害は後になって顕著に現れる。 $\delta$ -AL, PBG からの Protoporphyrin 合成も一旦生成された Coproporphyrinogen がミトコンドリアの作用により protoprphyrin へ変わったものである。

尚同時に Porphyrin 及 Porphyrinogen の代謝も併せて報告したい。

Table 1                      Activitives of the Porphyrin-Synthesizing Enzymes  
in Red Blood Cell and Liver

	Red Cell	Liver	Localization of the Enzyme
ALA Synthase	High	Low	Mitochondria
ALA Dehydrase	High	High	Supernatant
PBG-Isomerase	High	Low	Supernatant
UROGEN-ase	High	Low	Supernatant
COPROGEN-ase	High	High	Mitochondria

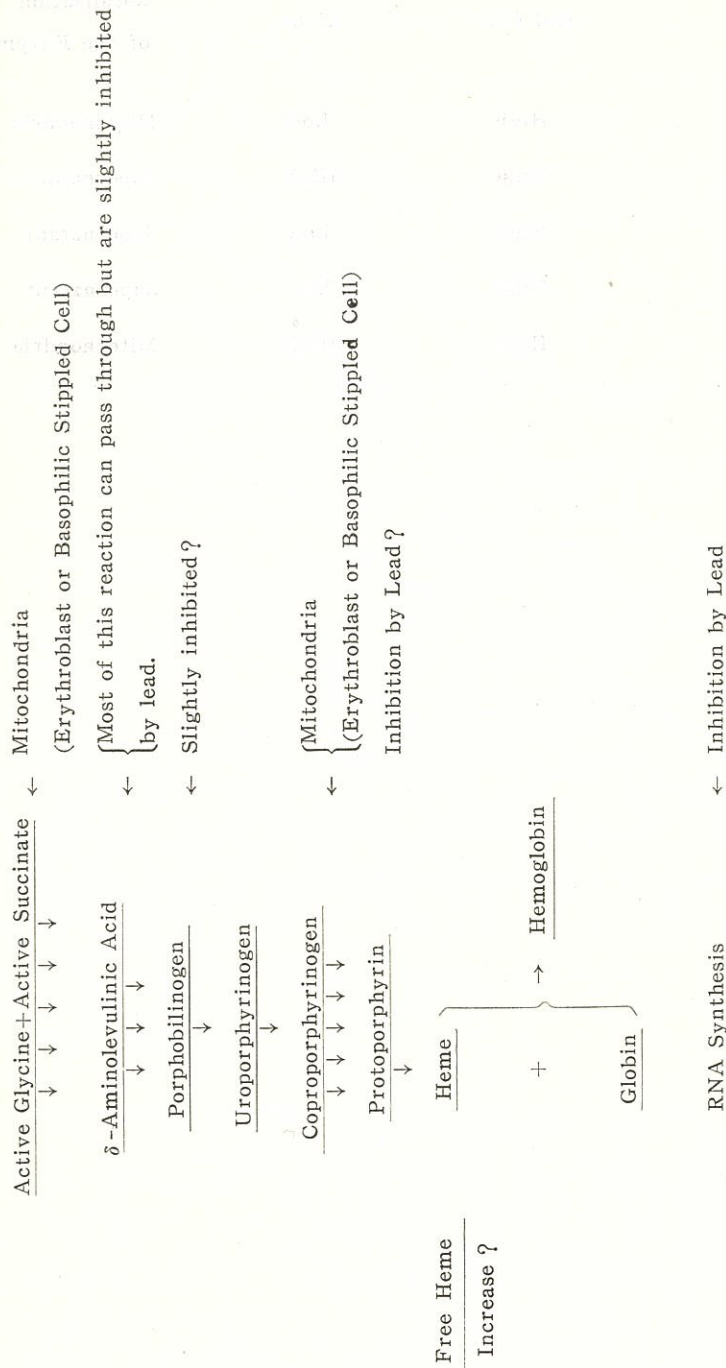


Fig 2 Pathway of Porphyrin Metabolism in Lead Poisoning

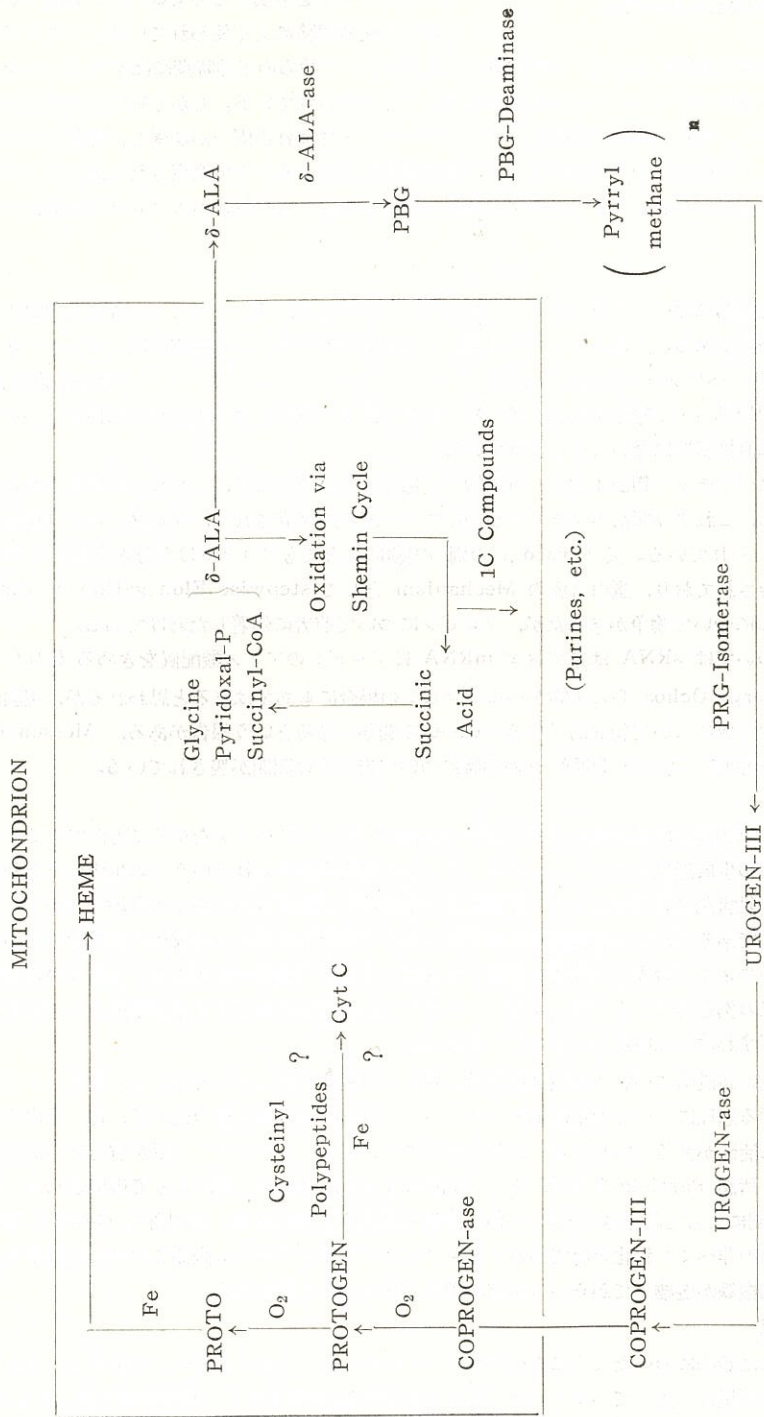


Fig 1 Distribution of the Enzymes of Porphyrin and Heme Biosynthesis in the Cell.

はしがき

### 3. ヘモグロビンの生合成について

米 山 良 昌

(東京大学医学部栄養学教室)

ヘモグロビンは通常骨髄の赤芽球系の細胞でつくられて、流血中の赤血球中では合成されない。唯例えば網赤血球のような未熟赤血球や鳥類の有核赤血球では *in vitro* でヘモグロビンを生成するので $C^{14}$ アミノ酸や $Fe^{59}$ を用いた生合成の実験によく使われている。ヘモグロビンの生

合成は赤芽細胞の成熟と密接な関係にあつて、Threll, 妹尾らによつて始めの未熟時期にはグロビンの生成が大であり、成熟してくるプロトポルフィリン、ヘムの生成が増大してくるとされている。しかし哺乳類の流血中の赤血球では全く生合成が行われない。最近赤血球の成熟にエリトロポエチンと呼ばれる因子が関係し、腎臓がその主な生成場所であるとされている。この因子は $Fe^{59}$ の流血中よりの消失速度を大にすることで測定されておりヘモグロビン生成と密接な関係にあるものと思われるが、これらの成熟と関係ある事項は除いて狭義のヘモグロビン生成についてのべたい。

#### グロビン生成

ヘモグロビンの生成は化学的にはヘム生成とグロビン生成にわけて考えられる。グロビン生成は蛋白質生成の好材料の一つとして種々の報告がある。主なステップは1表のようなものである。この生成にはエネルギーが必要なのでATPが必要であり、且、ペプチドが縮合する場合としてミクロゾーム(リボゾーム)の存在が強調される。核酸としてsRNAとmRNAの二種類の異ったRNAが必要である。DNAは網赤血球には核がないので通常ないとされ、グロビン合成に直接影響はないものとされている。

ウサギのヘモグロビンはペプチド鎖が4個ありN末端が全部ヴァリンであるが、グロビンが合成される場合、N末端がリボゾームに附着し、これより順次ペプチドがのびてグロビンが完成されて、リボゾームより遊離することがSchweetらによつていわれている。又Dirzroらの別の実験によつてもグロビンは多分N末端より順々に伸長してゆくということが支持されており、蛋白質合成のMechanismとしてstepwise Elongationとsimultaneous Condensationの二つについて論争があつたが、グロビンについて前者に帰着したわけである。

核酸とグロビン合成についてはsRNAはさておきmRNAはグロビンのアミノ酸配置をきめるものと考えられており、最近のNierenberg, Ochoaらの実験がヘモグロビンの場合にもあてはまると思われるが、実験的根拠はない。異型ヘモグロビンの生成について特異的DNA, RNAの関与があるという報告がある。Messenger RNAとしての網赤血球のDNAの回転、それとDNAとの関聯について未解決の問題が残されている。

#### ヘム生成

有核赤血球や網赤血球の浮遊液又は溶血液に $Fe^{59}$ を加えて解置すると $Fe^{59}$ ヘミンを得ることができる。この場合はプロトポルフィリンまでの生成過程とこのプロトポルフィリンへの鉄の組み入れというヘム生成の全過程を観察していることになる。種々の阻害剤の影響がこの系(浮遊液及び溶血液)で観察されたがこれも $Fe^{59}$ のヘミンへの組み入れで結果を出しているのであるが、その影響は単に鉄の組み入れのみならず全ヘム生成への影響をみていることになる。この種の実験はポルフィリン合成の中間体を基質にすれば、それから後段の反応に対する種々の阻害剤の影響をみる事ができる。一二の例をあげてみよう(1図)。ただしこれが直ちにそのまま或る薬剤のヘム生成への阻害によるものとすぐ結論を下すわけにはゆかないであろうと思う。

プロトポルフィリン合成の諸段階については佐野助教授より詳しい説明があつたので略して、鉄とプロトポルフィリンよりプロトヘムの生ずる過程について簡単に御紹介したい。この系は幼若赤血球の他に肝、腎、筋肉等にも存在し、ミトコンドリア分画に活性があるといわれる。幼若赤血球についてもミトコンドリア説が有力であるが核やミクロゾームという説もある。所謂Particle Boundでコール酸によつて抽出され、熱によつて破壊される。還元剤によつて活性化されSH阻害剤によつて阻害されるのでSH酵素であろうと思われる。鉄以外のCoやZn等は基質にはならない。生体内の二つの非ヘミン鉄化合物であるシデロフィリンとフェリチンも直接この系には利用されず、一旦還元剤その他によつて無機鉄が遊離してからヘム生成に利用されるものと思われる。

#### ヘム生成とグロビン生成

ヘモグロビン合成の過程には始めのべたように先づグロビンが出来、ついでおくれヘムが生ずるとされるが、最後にはヘムとグロビンが過不足なく生じてヘモグロビン分子が生成する。実際兎や犬の網赤血球を使つても*in vitro*の実験ではヘムとグロビンの生成速度はほぼ等しいという結果が得られている(2表)。しかしアヒルやニワトリの有核赤血球では同様の実験を行つてもヘム生成の方が大であるという結果が得られている(3表)。何故網赤血球と有核赤血球の間にこのような差異があるかは成熟度の相異、ポルフィリンあるいはグロビンまでのプールの物質の大小等考えられるがよくわからない。

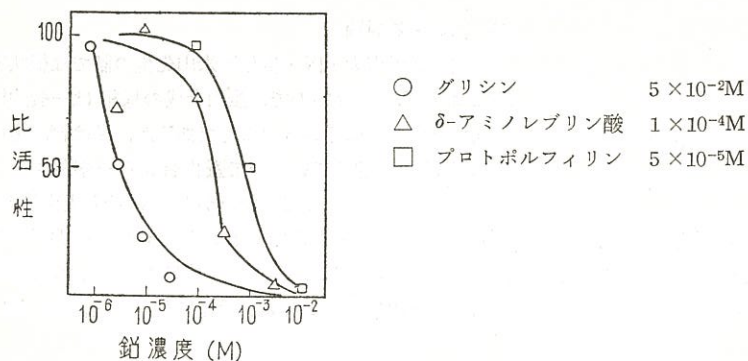
鉛イオンを加えて両者がどのように影響されるかを見た実験があるが、この場合も網赤血球と有核赤血球では態度が異なるようであり網赤血球ではヘムとグロビンの生成を同様に阻害するが、アヒル赤血球ではヘム生成のみ強く阻害するようにみえる(4表)。

さて以上はヘム生成とグロビン生成の全過程に何らかの Regulation があり、特に網赤血球についてはそれが著しいことを示しているかがそのメカニズムに関しては一切不明である。

これをヘモグロビン合成の最後の段階に求める可能性はないであろうか。実際グロビンが存在すると鉄とプロトポルフィリンよりのヘム生成が促進されるという報告がある。鉄、プロトポルフィリン、グロビン前述の酵素存在下にヘモグロビンが出来ることは私共によって証明された。しかしこの場合前述の報告とは逆に私達の実験ではヘムの生成が阻害されるので、ここに Regulation の可能性を求めるのは難しいであろう。

第1表 グロビン合成の諸段階

	関係する酵素	細胞分画	補助因子
1 アミノ酸の活性化	アミノ酸活性化酵素	上 清	ATP
2 活性アミノ酸の sRNA への移行	アミノ酸活性化酵素	上 清	
3 sRNA アミノ酸の mRNA への移行	Tranfering Factor	上 清	GTP
4 mRNA 上でのペプチド結合生成	?	ミクロゾーム	
5 mRNA のペプチドより上清への蛋白質の移行	酵素反応或は非酵素反応	上 清	ATP ?



第1図 アヒル溶血液のヘム生成に対する鉛の影響

第2表 兎網赤血球のヘム生成とグロビン中へのグリシンの組み入れ速度の比較

解置時間	実験数	ヘム合成(A)		グリシン組み入れ(B)	
		mM	1モル1ヘム	mM	(B) (A)
1	2		1.67 ~ 2.87	2.19 ~ 2.80	1.14 ± 0.24
2	21		2.48 ~ 7.51	2.71 ~ 6.30	0.98 ± 0.15
4	16		2.53 ~ 9.31	2.70 ~ 10.33	1.06 ± 0.14

第3表 アヒル赤血球の放射性グリシンのヘムとグロビンへの組み入れの比較

孵置時間	グロビン中のグリシン 1モル当りのc. p. m(G)	ヘムよりプロトポルフィリン 1モル当りのc. p. m(H)	H/G
1	$6.2 \times 10^7$	$10.5 \times 10^8$	16.9
2	$12.0 \times 10^7$	$19.1 \times 10^8$	15.9
4	$24.3 \times 10^7$	$31.3 \times 10^8$	12.9
10	$45.2 \times 10^7$	$54.1 \times 10^8$	12.0

第4表 鉛イオンのヘム生成とグロビン生成に及ぼす影響

鉛の濃度	ヘムの組み入れ	グロビンへの組み入れ	
ブランク	100	100	犬網赤血球
$2 \times 10^{-5}$	85	92	
"	89	103	
"	79	105	
"	91	98	
$2 \times 10^{-4}$	70	69	
"	84	81	
"	63	70	
"	70	70	
ブランク	100	100	アヒル網赤血球
$5 \times 10^{-4}$	23	71	
ブランク	100	100	アヒル赤血球
$10^{-5}$	82	108	
$10^{-4}$	33	96	
$10^{-3}$	4	106	

## 総合討論 (I)

座長 久保田 重孝 (全衡協)

### (1) に対する討論

中尾(横浜市大・医・生化) 米山先生の話では網状赤血球には DNA が無いので、蛋白合成の様相は一般的モードと同様とは考えにくいとのことであるが、私は網状赤血球中に DNA を認めているので蛋白合成の一般的シエーマと同様と考えてよいのではないかと思ふ。それと関連して、

木村先生のベンゼン投与時に DNA の塩基組成が異なるという報告は興味ある問題である。ただ g 当りの DNA 量は変わるが、細胞当りの DNA 量は変わらないとのことですが、グアニンの増量してゆくのは理解しにくい。つまり細胞当りの DNA のグアニンが増量すべきであり、そのためには、細胞中で DNA 合成が活発でないといふことがわらうと思うが?

木村(労衛研) DNA 量は DNA 分画として求めたが、Schmidt-Thanhauser 法による塩基、糖、リンの分析値から求めた DNA 量が一致しない。量の変化がみられないのは塩基の分析値から DNA 量を算出した場合であり、糖あるいはリンから算出すると増加又は減少する。私のデーターからでは DNA 全般についての論議はできないが、DNA の糖その他の部分に変化があるらしいことが予想できる。

中尾—核1個当りの DNA 量についてはどうか。

木村—糖、リン及び塩基の分析値から算出した核当りの DNA 量について述べると、糖で分析すると増加、リンをもとにすると減少、塩基をもとにすると変化なしの成績となっている。

米山(東大・医・栄養) X線照射を行った際は白血球系が主として障害をうけるのであるが、木村先生の実験では骨髓を用いておられるので、白血球、赤血球等いろいろの系が混つたものを観察しているが、この点についてはどうでしょうか。

木村—実験上赤血球、白血球系を分けることが困難であるので混合系についてしか実験をしていない。

中尾—DNA の塩基組成で種特異性は一般に認められるが臓器特異性は存在しないといわれているから木村先生の行った混合系試料のデーターでよいと思う。

木村—DNA の種特異性は認められているが臓器特異性はまだ明らかでないといふ私と考えている。一方ベンデックは

臓器特異性があるとクロマトグラムの成績から結論し、又同様の実験で大沢は特異性を認めておられない。

佐野(京大・医・公衛) — 細胞1個当りの DNA が変わらないのに Methylgreen-Pyronine 染色の染りが悪いというが、この染色法は技術的にもむづかしい方法であるから、Feulgen 反応を行う必要があるのではないか。また凍結保存した試料を用い、核の分離に 0.25M の  $\text{CaCl}_2$  含有蔗糖を用いておられるが、最近 Mirsky のの所では 2.4M の蔗糖を用い、また Homogenization の条件を厳密にすると intact な核がえられるといっている。いずれにせよ試料の凍結→融解という操作を加えるのはどうであろうか。

木村 — Feulgen 反応は行ってみたかったがそこまで手がまわらなかった。DNA 量に変化しないのに Methylgreen-Pyronine 染色で色が不鮮明になったのは、この染色法が熟練を要することもあるが、実はこの染色機構が充分明らかでなく、1つの考えられる可能性として、Double-Strand の構造を示すときに綺麗に染まるのであり、ベンゼン中毒時には、Double-Strand をとらずにルーズになつているのかもしれないし、また1部は Double-Strand であるが、1部は切れて Single-Strand になっているのかもしれない。いずれにしてもこのような DNA の存在することが興味深い点である。核のとり出し方については1957年のヒストンをとるのに Mirsky が用いた方法に依ったが、凍結試料を用いる点は御指摘の方法が良いかもしれない。

## (2) に対する討論

浦田(公衆衛生院 栄養生化学) — 主として佐野先生の講演に対する追加を行ないたい。鉛中毒時にポルフィリン代謝異常が起り尿に ALA, PBG が出てくる。動物にポルフィリン異常代謝をおこさせる物質は鉛以外にもいくつかあって、例えばある種の有機化合物があげられてる。われわれはコリジン誘導体の 3,5-Dicardoxy-1,4-dihydrocollidine を用いたが、これをモルモットに投与すると、大量の PBG, ALA が尿に出てくる。開腹して紫外線を照射すると、肝・小腸に桃色の螢光があり、とくに肝に強い。肝を鏡検すると多くの桃色顆粒がみられる。ポルフィリンの溶剤を加えるとこの螢光が消失する。この螢光物質は Homogenize すると細胞外に出、その99.5%はプロトポルフィリンであった。このように肝に大量のプロトポルフィリンが蓄積する理由には多くの可能が考えられる。即ちポルフィリンの過剰生成、鉄の組入れが減じ、プロトポルフィリンがたまる。あるいは体の他の部位でプロトポルフィリンが大量生成し、これが肝れるなどである。われわれの実験結果から、肝のミトコンドリアで ALA の過剰生成があつて、これがプロトポルフィリンに変ることが分った。ALA の過剰生成の理由については検討中であるが、この中毒時に ALA-Synthetase が induce されると思われる結果をえている。コリジン誘導体による実験的ポルフィリン症では骨髄及び末梢血液の赤血球系細胞には変化がない。鉛中毒では肝に著変がないとされているが、コリジン誘導体中毒でみられたと同じ機構による変化が肝・骨髄におこっているのではないかと想像している。

## 綜 合 し て

長谷川(労衛研) — ベンゼン中毒時には白血球系の障害が強く、赤血球系の変化はあまり取上げられていないが、ベンゼン中毒ラットの Hb では電気泳動像・クロマトグラフの挙動に変化を生じている。この変化は総 Hb の 10—20% に当る微量部分の変化である。こうした変化が骨髄中で生じたか、または流血中でおこったかについてであるが、ベンゼン代謝産物のフェノール類は流血中に認められず、ただ流血中の異常物質としては、ヘム蛋白の一種であるカタラーゼ活性を阻害する物質があるだけであり——この物質とカタラーゼの反応は可逆的である——、またベンゼン投与後1—2週して Hb に変化が生じるところから骨髄でおこっていると考えられる。すなわち Hb の蛋白合成の異常が考えられる。

長野(横浜市大・医・生化学) — 木村先生の御実験で Base の C/G と A/T とがベンゼン中毒時には対応しないということと関連して、この際に Single Strand を考えねばならぬが、細胞分裂に対するベンゼンの影響はどうか

坂部(労衛研) — ベンゼン中毒時の形態学を担当した河合が不在なので詳しく述べられないが、分裂は Metaphase で止つていたように思う。

佐野 — 中尾先生は網状赤血球中に DNA があるといわれたが、網状赤血球が増量してゆくときには DNA 量もふえてゆくか。

中尾 — そこまで詳しくはみてない。

佐野 — basophile Punktierung の時の DNA をはかったが、Indole 反応を用いると綺麗に DNA をみることができる。DNA だとすると basophile Punktierung は核から生じたことになる。そこでこの点をしらべようと思ひ、RNA-ase を働かすときれいになつたので RNA ということが分った。しかし DNA らしいものも存在す



るようなのでお聞きした訳です。

中尾一流血中の網状赤血球で Hb の合成が認められるが、もしも DNA が存在しないとすると理窟にあってこないし、別の機構を考えなくてはいけなくなるので、DNA の存在を検討した結果若干あることをみている。ただこれはまだ予備実験の段階ではあるが、とにかく DNA はあるようである。

#### 4. 赤血球の細胞生化学

中 尾 真  
(横浜大学医学部生化学教室)

赤血球は水以外の大部分がヘモグロビンによってしめられて居り、生物個体からみれば酸素と炭酸ガスの運搬をその重要な役割とする細胞である。しかし同時にそれは独立の細胞であり、独立の細胞としての生活を営み、その生活が正常に続けられぬかぎり、生物個体にとっての二機能も果す事はできない。

ここに赤血球を一個の細胞として扱う細胞生理学乃至は細胞生化学の意味がある。

赤血球が細胞として扱われる場合、他の一般細胞からきわだつた特徴をまずあげてみよう。

- 1) 構造が単純である。成熟型は核、ミトコンドリア、ミクロゾームをもたない。
- 2) 代謝が単純である。簡単な構造に相応して代謝が単純である。TCA サイクルは存在しない。酸素消費も正常の場合はほとんど認められない。蛋白合成、核酸合成、脂質合成は行われない。それに反して所謂解糖系は活発であり、ヘキソーズモノリン酸回路の全酵素が存在する。これらにつらなるリン酸代謝或いはエネルギー代謝は活発であり、またスクレオチド代謝も部分的には活発である。成熟型ではヘムの合成も行われていない。特徴ある代謝系としてはメトヘモグロビンをヘモグロビンに還元する系が存在する。これは糖代謝系で生産された DPNH 或いは TPNH を用いてメトヘモグロビンを還元する。
- 3) 孤立した細胞で単一に多量に入手し易く、体外で長時間生存させ易い。
- 4) 細胞の寿命の測定は理論的に困難な問題を含むが赤血球では輸血後寿命の形で一応の判定をする事ができる。寿命の終つた細胞は輸血後24時間内に流血中より消失し、健全なもの半減期後30日で消失していく。
- 5) 特異な形態と能動輸送の機能を有する。各種の物質が能動輸送されると云われるが充分その活性の強いのは  $K^+$ 、 $Na^+$  である。

これらの特徴は細胞の生化学からみて極めて有利な材料と考えさせる。従つて数多くの研究が積み重ねられつつある。ここではその中で赤血球の寿命を支配する因子としてのエネルギー代謝についてのべ、又それとフェニルヒドラジン等の中毒との関連を論じたい。

本質を損じない範囲ででき得る限り条件を簡単化して考察するのは方法論として重要な事項の一つである。ここで *in vivo* の細胞の生活を論ずるにあたり、*in vitro* の細胞の生活を取りあげたい。血液が個体として内部環境の一部を形成している事、即ち赤血球の浮遊液が自ら内部環境にあたると云う特殊性から云つても或る程度、この事には妥当性がある。

血液をクエン酸緩衝液で凝固をとめ、燃料としてグルコースを充分に添加したものは所謂 ACD 保存血である。(血液：保存液 4：1 の容積比)。これを  $4^{\circ}C$  に保つと3週間でもかなりの障害がおり、輸血後寿命は平均70%に低下する。その期間におこる生化学的变化は主として次の様なものである。

- 1) グルコースの消費、乳酸、ピルビン酸の蓄積が多量になるが、グルコースの消費速度は減弱する。その原因はグルコースを活性化するために用いられる ATP のレベル低下である。糖代謝速度が低下すれば ATP レベルは低下するので悪循環がおこる。
- 2) 溶血しないかぎり、ヘモグロビン自身及びメトヘモグロビン還元酵素は安定である。メトヘモグロビン還元を用いられるのは TPNH でも DPNH でもよいので、長期保存の結果グルコースの代謝がとまり、ヘキソーズモノリン酸回路の回転がとまって TPNH の生産がとまり、又解糖系の流れがとまって DPNH の生産がとまっても乳酸の蓄積が充分であれば、乳酸からピルビン酸に逆流する事によって DPNH が生産される。従つてメトヘモグロビンの還元がおこる。これらはヘモグロビンとそれを直接保護する系は安定であると云う事を示している。

3)  $K^+$ 、 $Na^+$  の細胞内外分布は平均化される。しかしながらこの現象は温度の影響が強くあらわれているという事実、犬猫の赤血球は新鮮血でも赤血球内外の分布があらかじめ平均化されていると云う事実などからして、細胞の生活にとっては本質的と考えにくい。

我々は保存血の保存中に行われる ATP の崩壊機構を研究して仮説をたてた。これによると ATP は AMP をへて最後はヒポキサンチンにいたり、そのリボース部分は再びエネルギー代謝に利用される。この経過中 AMP の脱ア

ミノが不可逆だと云う所がかなめである。

ATP, ADP, AMP は赤血球内に入らないので、赤血球内に ATP を増加させようと云う試みが Gabrio 等によつてスクレオシド添加法として発表された。しかしこの効果は極めてかぎられて居る。細胞内に ADP もしくは AMP が充分量存在する時のみ有効であるからである。我々の見出したアデニンとスクレオシドを同時に添加する方法はその欠点をもたない。その場合 8 週間以上保存した赤血球でも ATP は劇的に増大して、正常の  $\frac{1}{20}$  以下であつたものが正常値に戻る。このメカニズムは極く微量残存した ATP がひきがねになつてはじまる一種の positive Feedback と思われる。あらかじめアデニンとイノシンを添加した保存血は 8 週後でも ACD 保存血の 3 週に匹敵、或いはこれを越える糖代謝、溶血抵抗、輸血後寿命を示す。又形状も ACD で 4°C 保存を行うと数日で金米糖、数週以後は平滑球となるが、新添加剤の方は 8 週後も円盤である。これらは ATP レベルが十分に維持されている事にもとづく。(赤血球の形状が ATP レベルによつて可逆的に変化する事は我々によつて見だし、以後種々の実験によつてたしかめられている。)

次に ACD で 8 週間保存した赤血球にアデニン、イノシンを添加し 37°C に 3 時間おいた後、対照の 8 週間 ACD 保存血と比較すると ATP レベルは上昇して正常になるが溶血抵抗、酵素活性はもとに戻らない。所が輸血後寿命は若がりやをさせたものの方が対照の数倍の値に達する。この事実は保存血の寿命が溶血抵抗によつて規定されるのではなく、ATP レベルによつて規定されると云う事を明確に示す。

所で体内に於て赤血球の寿命は 120 日間であるが、その経過中に ATP レベルが低下する事は Lohn 等及び Bernstein によつて示されて居る。彼等は単にその事実から、ATP レベルの低下こそ赤血球の終焉の原因ではないかと示唆しているが、上述の結果はそれに実験的根拠を加えたと云う事ができよう。ATP レベルの低下をひきおこす原因については *in vitro* と *in vivo* とがかならずしも同一ではないかもしれないが、これは次の問題であろう。

Mohler 等によるとフェニルヒドラジンと血液を *in vitro* で 37°C におくと、Heinz 小体の形成と同時に、糖消費の僅かの亢進と、ATP レベルの若干の低下がみられると云い、群大中尾喜久教授も *in vivo* でヒドロキシルアミンが赤血球内 ATP の減少をひきおこすのではないかと云う結果を得られている。ATP の低下が赤血球の溶血をひきおこし、貧血を生ずると云うわけである。ここに云う溶血は習慣的に用いられる溶血であつて、さきにのべた我々の実験から云えば、滲透圧に対する溶血抵抗ではなくて、ATP の低下そのものが体内破壊をうながすのであるからして恐らくは赤血球が網内皮系に捕捉された後溶血するのであろう。混乱をさけるために流血中より消失すると記載すべきであらう。ATP レベルの低下が体内破壊をうながすメカニズムについては、赤血球のマクロの形態ではなくて表面微細構造が関係すると思つて居る。

フェニルヒドラジンが ATP レベルの低下をひきおこす理由として Mohler 等は ATP の新生は障害されず、破壊が促進されると述べているが、その同じデータを、ATP の新生が侵されると考えることもできる。オキシヘモグロビンとフェニルヒドラジンによつて生じた  $H_2O_2$  が、カタラーゼ或いはペルオキシダーゼによつて除去される所をフェニルヒドラジンによつて阻害され、 $H_2O_2$  によつて還元グルタチオンその他の還元性物質が消費され、酸化に弱い解糖系の一つもしくは幾つかのメンバーが障害される事が原因ではなからうか、無カタラーゼ症との関連も興味がある。

## 綜 合 討 論 (II)

座 長 米 山 良 昌  
(東大・医・栄養)

坂部(労衛研)一輸血後の survival Curve は exponential になるとのことですが、始めの急な Curve と後のなだらかな Curve、即ち Clearance に似た 2 相性があるのではないか。

中尾一保存血では、生活力のなくなつた赤血球は 24 時間以内に流血中から消失し、それ以外のものは exponential

にへり、半減期は 30 日である。

坂部一赤血球の破壊に関しては、単に赤血球の膜の微細構造がだめになり、内網皮系にくわれる場合の他に、別な因子があることが考えられないか。

中尾一Haemolysis がさきにおこる事は全くないとは思わないが、然し滲透圧に対する溶血抵抗が悪いのにも拘らず、ATP レベルを上げると寿命がのびるから、機械的な抵抗の減弱による溶血はおこらないと思われ。なお Phenylhydrazin による Heinz Body 形成の場合にも、溶血抵抗はへらないとの報告がある。

新山(労衛研)一赤血球では、E-M 系が Pentose Monophosphate Shunt よりつよいといわれましたが、Met-Hb 形成の時には Pentose Monophosphate Shunt の酵素系の Activity がたかまるか。

中尾—そういう事はある。典型的な例としては、メチレン青のような色素を入れた時、色素は Met-Hb の Reducer と Acceptor となるが、この場合には Pentose Monophosphate Shunt が非常な勢いで動く、この事は C<sup>14</sup> をつかった実験で示されている。

新山—赤血球の中の ATP レベルを維持する事は赤血球を盤状に保つために一番本質的な事と考えてよいか。

中尾—本質的という内容だが、ATP が働きかける相手方の問題もあり、これは恐らく Protein だと思う。

新山—赤血球の膜の透過性を正常にするのは Protein だと思うが、Energy rich のものが要という事か。

また赤血球への Glucose の取り入れは Active Transport の形と考えてよいか。

中尾—Glucose の取り入れは動物種によつても異なるが、Active Transport という事は証明しきれない。はつきり証明できるのは、Na と K の Transport だけである。

鈴木（東大公衛）—ATP レベルがかかわると電解質の動きはどうなるか。水銀の実験で、赤血球に Hg イオンを加えると赤血球中に Hg イオンのとり入れがあるといわれているが、ATP と形の問題にはふれていなかった。

中尾—Na, K は Active Transport であるから ATP と関係があるが、形の変化とは関係しない。形の変化は 8 週間保存血でも ATP レベルをもどすと 30 分位で戻り、1 時間乃至 2 時間で完了するが K の取り入れは序の口である。

山村（慈恵大・公衛）—Met-Hb の還元において、動物種に相異があり、例えば兎では早い、人、犬では還元が殆ど認められないがその理由はどうか。

中尾—自分では実験していないので想像だが、Met-Hb Reductase の性質、磷酸代謝に差がある。Embden-Myerhof 系と Warburg-Dicken 回路系のかねあいも動物で異なるので TPNH と DPNH の出来る割合に変化があると思う。その他調べてみないと分らないが、いろいろの場合が想定できると思われる。

山村—血漿環境と Glucose Ringer 液に ATP を加えた環境では Met-Hb の還元速度がかなりことなるが、ATP 以外に何か因子がないか。

中尾—解糖活性はどうか。即ち Glucose 消費は。

山村—血漿環境の方がたかい。

中尾—推測であるが、洗う操作で Nucleotide の破壊、Mg, 無機燐の消失があるのではないか。

山村—Met-Hb の還元を促進するのはメチレン青を加えるのが一番よいか。

中尾—実験の目的がよくわからないが、Nucleotide を入れるという手はある。Nucleotide を入れれば解糖活性はおちても、糖の磷酸化はすすむので、DPNH, TPNH の生産はある。

## 5. ハイイツ体について

久保田 重 孝  
石 津 澄 子  
(全国労働衛生協会)

(1) 1890 年、Heinz, R. がフェニールヒドラジン中毒家兎の赤血球に Heinz 小体を見出してより、現在まで多くの医家研究者によつて、本小体の臨床病理学的研究、実験的研究が行われ、その本態、発生機序、メトヘモグロビンとの関連、形態学的特異性などが検討されて来た。

私共は産業医学の立場より、芳香族ニトロアミド化合物を取扱う染料工場、化学工場作業者について、臨床的観察を行ない、本小体の早期診断的意義を検討する一方、その本態についても、実験的研究を行つてきたので、その成績を御紹介し、御批判を頂きたいと思う。

### (2) Heinz 小体 (H 小体と略) の形態学的所見及び染色特異性

H 小体の形態学的特異性は高度な光屈折性の丸い封入体として、赤血球の周辺に偏在し、多くの場合、1 ヶの赤血球に 1~2 ヶ見出されること。また、生体内で漸次その大きさを増し 1~2  $\mu$  にも達し流血中から消失してしまう (脾臓で捕捉、破壊される) ことなどである。

私共が PCNB 中毒 (p-Nitrochlorobenzene) 家兎について、時間的に観察した成績でも、毒物投与後短時間で、微細な点状顆粒として血球の周辺に 1 ヶ見出されるが、時間の経過と共に漸次その大きさを増して、18~24 時間後には殆んど全赤血球に 1~2  $\mu$  の小体として明瞭に見出されるようになる。

同じ経過を位相差顕微鏡で観察すると、初期の点状顆粒は盛にブラウン運動をする黒色顆粒として見られる事であつて、この所見から Heinz 小体の本態を究明しようと考察している研究者もいる。一方、電顕像から本小体の本態を究めようとする研究も多く、Pernis, B. らはフェニールヒドラジン海兎赤血球の Heinz 小体について観察し、Heinz 小体は均質で一定の構造なく、赤血球膜とは特に密接な接触なく、出現するようであるといつている。

私共も Heinz 小体含有赤血球をオスミウム酸固定，超薄切片で5万倍までの拡大で観察したが，Heinz 小体には特に一定の構造なく且つ周囲の血色素と殆んど同じ Density をもっていることを見出した。又 Heinz 小体の染色特異性については初期の Heinz の報告にもあるように，プリラントクレシール青，ニール青，メチル紫などの塩基性色素に好染するが酸フクシン，エオジンなどの一部の酸性色素にも好染する。

更に私共は Heinz 小体について，組織化学的検索を行ない，その特異性を検討してみた。

第一表はその成績の一覧でリポイド，蛋白，血色素，SH 基等を証明したが，核酸，糖，鉄反応等については陰性の成績を得た。

最近慈恵医大，小机は本小体をフェノール，オーラミン蛍光色素で染色後，蛍光顕微鏡で観察し，Heinz 小体が黄色の華麗な蛍光を出す事を見出している。又，Acridine Orange, Phenol-Auramine で二重染色すると，網状赤血球との対比が鮮かに蛍光染色されるという。

### 5. 第1表 ハイイツ小体の組織化学的所見

	染 色 法	成 績
リ ポ イ ド	Daddi 法	—
	川村，矢崎法	+
	オイル赤～O	—
	ズダン黒～B	—
	Smith Dietrich 法	+
蛋 白	オスミウム酸	—
	ニール青	+
蛋 白	Hg-BPB	+
	Millon	—
	キサントプロテイン反応	—
	安岡・市川法	—
SH	Benett 法 Mescon et Flesch 変法	+
核酸	メチル緑・ピロニン	—
血 色 素	パテント青	+
	Lepehne 法	+
鉄	ベルリン青反応	—
糖	PAS	—
	Best カルミン	—
	メチル紫	+
	石炭酸フクシン	+

#### (3) Heinz 小体と Met-Hb との関連

Heinz 小体を好発させる毒物，又は薬品は一方に於ては血液に酸化的に作用し，メトヘモグロビン (Met-Hb) を形成させることが多いので，Heinz 小体と Met-Hb との関連についてはよく検討されてきたが，現在尚不明の点が多い。

報告者によつて，両者は密接な関連をもつとの説を持ち，又，逆に，Heinz 小体と Met-Hb の間には特に関連はないとの説を支持する人もある。

私共はこの点を検討するために，前述の PCNB 中毒家兎について，両者の関係を時的に追求してみた。即ち，PCNB. 0.5g/kg 皮注射家兎について，注射後 4，6，9，12，15，18，24時間目に於ける Met-Hb 量と Heinz 小体の量的推移を見ると，先ず Met-Hb は 4～6 時間で増加し始め，12時間前後で一旦減少した後，18～24 時間で再び増加するという経過を示し，32時間前後では検出し得なくなるという成績を得た。

Heinz 小体は注射後 4～6 時間後頃では点状の顆粒として，見られるにすぎず，Heinz 小体含有赤血球も少ないが，12時間前後より，多くの赤血球に明瞭に見出されるようになる。

この事より Met-Hb の二度目の増加が H 小体の完成又は増大に関連するのではなからうかを推測した。

そこで、私共は私共の実験成績の中のこの二相の Met-Hb の推移について、Evelyn-Malloy 法で同じ Met-Hb として、定量されてはいても異質なものであるかを考慮し、下記の如き検討を行った。

即ち、毒物投与後数時間後の家兎血液と、一旦 Met-Hb 量の減少し、再び増加した18~20時間後の血液をそれぞれ凝固防止し、37°C に3時間保持し、前後の Met-Hb 量を測定したところ、前者の血液 Met-Hb 量は著しく減少しているか、又は全く証明されないのに、後者の血液 Met-Hb 量は3時間前、即ち採血時よりわずかに減少しているか、又は殆んど変化していない事であつた。

この両者の Met-Hb の減少(おそらく還元)の差異が Met-Hb 自身の機能的変化を示唆するのか、又は血球、血清の関連酵素の障害を示唆するのかは不明であるが、Heinz 小体の萌芽、完成と関連する所見ではないかと推測している。

#### (4) Heinz 小体の化学的組成

Heinz 小体はアルコール、エーテルなどの有機溶剤に不溶、苛性ソーダ、氷醋酸に易容で、リポイド、蛋白、血色素及びその近縁物を含む事等が見出されているが、その起源に関しては諸説が立てられ、意見の一致を見えない。

私共は Heinz 小体の組織化学的染色で、本小体がリポイド、蛋白、血色素、SH 基等を含む事を明かにしたが、これ以外にも上代教室の指導を得て、本小体が血色素酸化物と深い関連をもつ事を分光化学的に分析した。即ち、PCNB 中毒家兎の全血(Heinz 小体含有血球)をとり、溶血させ、エーテル処理し膜成分を除去した後、Heinz 小体を集め、何回か洗滌した後、NaOH、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$  処理、可視部吸光像をみると、アルカリ変性ヘモクロームの像を得るが同時に赤色部(610~620m $\mu$ )に Choleglobin と思われる吸収像を得た。

更にこれを時間的に追求してみると、時間の経過と共に、 $E_{558}$  が減少し、中毒後24時間目頃のみ一過性に Choleglobin の吸収を見る事を観察した。中毒後48時間、72時間には Choleglobin の吸収は見出されない。

従つてこの所見から Heinz 小体は血色素近縁物を含むのみならず、Heinz 小体に於て、その酸化が進行するのではないかと推測した。

以上の成績以外にも我々は PCNB 中毒家兎血球を溶血、遠沈後、上澄液をシヤンペラン汙過した後(殆んど膜成分を含まない)37°C 24時間放置すると、形態、大きさ、染色性など、Heinz 小体と思われる沈澱物を得た。膜成分のみを同様に放置しておいてもかかる所見は得られない。

この成績は Heinz 小体の起源が従来考察されているように膜起源か又血色素起源かは決定し得ぬにしても、Heinz 小体の完成、増大について血色素が重要な役割を果している事は否定し得ないと思われる。

#### (5) Heinz 小体の臨床的観察

臨床的に Heinz 小体を観察した報告にアニリン、T.N.T、ニトロベンゼンなど、いわゆる工業中毒による症例とズルフォンアミド、アンチフェブリンなど、治療薬剤による中毒症例とがある。

私共は産業医学の立場から前者について、観察する機会が多いが特に染料工場で芳香族ニトロアミド化合物取扱ひ作業員又は火薬工場でニトログリコール、ニトログリセリン等を扱う作業員について何回かに亘つて、血液検査を行ひ二三の所見を得た。

これらの工場作業員について得た成績で興味ある事は、ヘモグロビン量、赤血球数、Ht 値(ヘマトクリット)などは軽度又は中等度減少している例が多いに拘らず、又明かに Met-Hb 形成を疑わしめる血液色調であるに拘らず、必ずしも Heinz 小体を多くの例に見出し得ず、ごくまれに新入者又は就業間もない作業員に高率に Heinz 小体を検出する事であった。

この所見を検討するために、PCNB を微量づつ2~3日おきに連続的に家兎に投与し、Heinz 小体と Met-Hb 量の推移を観察したところ、第一回目の注射時には Heinz 小体は多数出現し、Met-Hb も検出し得たに拘らず、その後注射を同じ量反覆しつづけても Heinz 小体は減少し始め Met-Hb 量も同じように減少の傾向を示すようになる。

この傾向は PCNB のみならず、ニトログリコールでも同様に、同じ量を反覆しつづけている限りに於ては、Heinz 小体は却つて減少してくるのである。

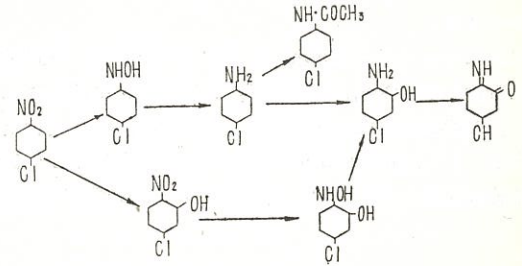
結局、生体の毒物馴化の現象と思われるが、恐らく Met-Hb の還元機序が賦活されるのか、その他複雑な関連酵素系の変化があつているものと思う。

何れにしても、この成績は実際作業管理上、Met-Hb 形成毒を取扱う作業員に特に長期勤続例に意外に Heinz 小体を見出し難い事と、何らかの関連があると思われる。

## 6. メトヘモグロビン形成 —特に PCNB に関連して—

吉田 克己  
山浦 熒子  
(三重医大 公衆衛生学教室)

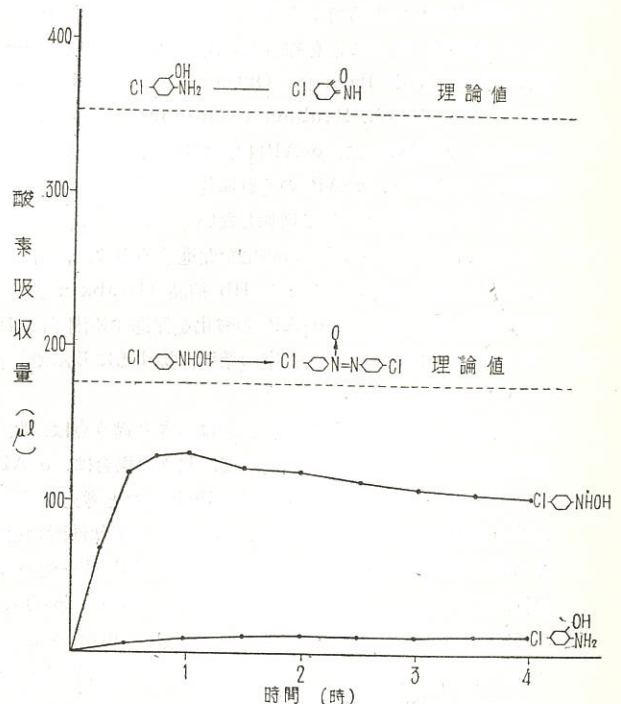
者筆らの行った実験は、先ず PCNB 中毒時に於ける Met-Hb 形成に局限して、PCNB の中間代謝と関連して、Heme 酸化の機構についての若干の知見を得たいと考えたものである。そこで先ず、PCNB の代謝経路を明らかにするために、次の模式を考え、最終産物と考えられる m-Chloro-o-aminophenol にいたる逐次の生体還元と一旦 m-Chloro-o-nitrophenol に酸化された後、逐次の生体還元による場合の二つを検討した。なおこの外に、更に PCNB の 2 分子還元、即ち、p-p'-Dichloro-azobenzen を経由する経路も一応検討すべきであるが、今回はこれを除いて考えた。又、それぞれの抱合体についても、一応考慮しないこととした。



上記の 2 経路中、いずれが主経路であるかを知るために、PCNB 投与家兎尿を処理濃縮して、ペーパー・クロマトグラフィーによる同定を試みたが、各物質のペーパー・クロマトグラフ上に於ける検出感度が悪く、充分確定的な結果は得られなかった。

そこで先ず、最も普通に考えられる上段の逐次の生体還元をとりあげ、その中の p-Chlorophenylhydroxylamine, p-Chloroaniline, p-Chloroacetanilide, m-chloro-o-aminophenol, p-Chloro-o-quinoneimine 及び、これに下段の m-Chloro-o-nitrophenol を加えた計 6 ケについて PCNB 中毒時に於ける主要な作用物質をうかがうために、それぞれ PCNB と当量になるように家兎に皮下注射し、その Heinz 小体及び Met-Hb 形成能を比較検討した。(この場合、nitroso 体についても考慮すべきであるので検討中である。)その結果、Hydroxylamino 体が最も弱力であり、Amino 体がこれに次ぎ、Aminophenol 体及び Iminoquinone 体はさらに低く、且つ Heinz 小体出現と、Met-Hb 形成とは可成りに類似した関係にあることが分った。そこで、Nitro 化合物中毒時に於ける Heinz 小体及び Met-Hb 形成について考えるにあたり、Hb の直接酸化を説明するためには、それぞれ供与体を考える必要があり、Aminophenol の場合は最も適当な酸素供与体としての Iminoquinone を考慮することができるので、最も魅力ある物質として、すでに中島らによって指摘され、研究せられているが、この Aminophenol ⇌ Iminoquinone 相互酸化還元系によってすべてを説明するのは、PCNB の場合にあっては可成り困難であり、むしろ、最も強力な両者の Former は、Hydroxylamino 体であると考へざるを得ないが、この場合には、Hydroxylamino 体の共軛酸化還元系を新たに検討する必要がある。

次に、上記の 6 ケの化合物の Met-Hb 形成機構を知る目的で in vitro に於ける Met-Hb 形成能をみると、Aminophenol が最も強力であり、Aniline は in vivo に於ける強い形成能にもかかわらず、全く形成能を有していない。又、酸素の存在しない場合には、いずれも Met-Hb を形成しないので、各物質が直接 Hb を酸化して Met-Hb を形



第1図 自酸化性  
各物質の濃度： $6.3 \times 10^{-8} M$

成させるのではなく、各物質が酸素をとって、それぞれ何らかの形、いわば、active intermediary に変化し、それらが、Hb を酸化するものと考えられるが、それぞれの物質個々の場合については、なお検討の余地が多い。

この被酸化物、即ち、Intermediate なる物の形成機構を知るために、ワールブルグ検圧法により各物質の自酸化性についてみると、Hydroxylamino 体が最も高く、且つ、その形成が早く、Aminophenol 体はこれに比してはるかに弱く、他には自酸化性がない。

そこで、Heubner らによって一部提唱せられたように、Hydroxylamino 体が 1/4 mol の酸素を吸収して Azoxybenzol 体を生成し、この両者の酸化還元系が、Met-Hb Former であることが O<sub>2</sub>-Uptake がこの考えによる理論値に割合近いことから一応想像せられる。併し、このためには Azoxybenzol の証明が必要であるので検討中である。

これに対して Aminophenol 体の自酸化性は、長時間にわたって徐々に増加し、Iminoquinone の理論値に容易に到達しないので、これは実際の in vivo に於ける Aminophenol の Met-Hb 形成能が相対的には低く、且つ、比較的長時間持続する理由の一端と合致するのではないかと考えられる。

なお、p-Chloroaniline に関しては、自酸化性による説明が明らかに不可能であり、且つ、Aminophenol 体による形成経過とも異なるので、酵素酸化その他の機構を追究する必要がある。

### アミノフェノール、チフェノールによる メトヘモグロビン 形成機序について

中島 泰知、楠本 繁子  
(大阪府立公衆衛生研究所 労働衛生部)

患者尿から分離された Benzoquinone Acetic Acid が強い Met-Hb Forming Substance であることを見出したという報告を読み、Heubner 説の中の Quinone 説に、特に、興味をひかれた。

- 1) そこで、Aminophenol (AP) あるいは Diphenol (DP) の自酸化時に赤血球を添加すれば、そこに生じている Quinone 体 (AP からは Quinoneimine, DP からは Benzoquinone) によって Met-Hb. (メト) が形成されて来るであろうと、単純に考えて、AP あるいは DP とヒト赤血球とを Incubation してみた。この結果、次のことを知った。①自酸化能のない Meta 体 (m-AP, Resorcine) はメトを作らない。②自酸化能のある Para 体, Ortho 体 (p-AP, Hydroquinone, o-AP, Pyrocatechin) はメトを形成する。このことから、Heubner の Quinoneimine 説は一応納得出来たが、③o-AP を赤血球と Incubation した時の O<sub>2</sub> 吸収量は、o-AP 自身の自酸化的 O<sub>2</sub> 吸収量より、約 7 倍程に増加する。(o-AP の自酸化的 O<sub>2</sub> 吸収は、もともと、p-AP のそれに比べて非常に低い。強い自酸化性を示す p-AP は赤血球と Incubation しても O<sub>2</sub> 吸収量はさして増加しない。) (Fig, 1)
- 2) この、赤血球が o-AP の酸化を促進する現象は、溶血液でも同様に起るので、赤血球の生理構造は関与していないと考え、分離したヒト Hb 結晶 (Drabkin 法) の溶液と Incubation したところ、やはり同様の結果であった。そこで、o-AP の酸化を促進する因子は Hb 自身に外ならないと考えた。
- 3) このころ、日医大、上代教室の業績に接するに及んで、我々の観ていた現象は、Hb の Oxidase 作用に似たものであることを知った。

然しながら、上代先生等の実験と、はっきり違う点は、我々の場合は、基質とは別に、特に Perturbator を添加していないことである。従って、我々の場合は、o-AP が基質であると同時に、Perturbator をも兼ねているために Hb に Oxidase 作用が現われたと考えなければならない。事実、①o-AP に限らず、Meta 体以外の AP, DP はすべて、Hb 溶液中に、絮状沈澱物を生じ、Hydrosulfite による reduced Hb 法による total Hb 値が減少する (Fig. 2.)。 (p-AP 量一他のものに就いては未実験—も同時に減少する。) この沈澱物は、アルカリ、エタノールに不溶部分があり (p-Quinoneimine の Polymer は可溶)、その性状に就いては、未だ充分調べていないが、どうも proteinous なもののように思われる。

total Hb の減少度は、分離 Hb > 溶血液 < 赤血球の順に著しい。②AP, DP との Incubation により、Hb が Heme と Globin にわれるのではないかと考えた。その根拠は、incubated Mixture の total Hb の定量値が、Cyan-met-Hb 法と Hydrosulfite による reduced Hb 法とで一致しないこと。即ち、incubated Mixture から、先述の沈澱物が出来てくるに拘らず、Cyan-met-Hb 法では、定量値は減少せず、ほぼ Const

に推移し、一方、reduced Hb 法では、定量値は漸減する。この、定量値が一致しない理由としては、一大変勝手な推測であるが一、AP, DP の作用により、splitting された Heme が Cyan-met- Hb 法では、Dicyan-Hematin となり、その最大吸収は 545m $\mu$  で、Cyan-met- Hb の 540m $\mu$  に近く、且、両者の Optical Density が似ているため、Cyan-met- Hb 法にかかるので、定量値は減少しない。一方、reduced Hb 法では Heme の吸収は 550~575m $\mu$  で、その最大吸収の 572m $\mu$  は reduced Hb の 556m $\mu$  からずれており、且、Density も小さい。従って reduced Hb 法にはかかりにくいので、定量値は漸減を示す。(Dicyan-Hematin の生成する可能性、及び reduced Hb 法で total Hb 値が、減少する理由について、日医大、岡崎、宿谷両氏の御教示をいただいた。) 以上に述べたような理由から、AP, DP は Hb に対して、Perturbator として作用する可能性を示していると考える。

- 4) 最初に述べたように、Heubner の Quinoneimine をメトヘモグロビン Former とする考えを一応納得したのであるが、その後、安定で実験に使い易い Quinone 体である p-Benzoquinone を添加してメトを生成させてみると、AP, DP の如き Phenol 体を用いた時とでは、メトヘモグロビン生成速度に、劇然たる差異がある。即ち、p-Benzoquinone では瞬時に、AP, DP では約 1 時間後に Maximum に達する (Fig. 3.)。このような、AP, DP のメト形成の”遅れ”の原因を次のように考えられる。Quinone 体の作用は、その非常に速いメトヘモグロビン形成速度から考えて、NO<sub>2</sub>、赤血塩と同じく、Primary に Heme-Fe を酸化し、他方、AP, DP 等の如き Phenol 体の作用は、Hb の Oxidase 作用を俟って Quinone 体が生成し、この Quinon 体が secondary に Heme-Fe を酸化するため、Hb の Oxidase 作用の速さが、メトヘモグロビン形成速度を律速するために遅れるのであろう。
- 5) さらに、NO<sub>2</sub>、赤血塩、p-Benzoquinone 等のグループでは、メト濃度が 100% 近くに達するのに、AP, DP では 3~4 時間 Incubation してもせいぜい 60~70% 止まりである。しかも、この時、O<sub>2</sub> 吸収は増加中で、停止していない。これは、未酸化状態で残存している。AP, DP が本来持っている Phenol 体としての還元性のため、メトヘモグロビンの% が一定レベル以上に達すると、逆に、還元されるためではなからうか。この、AP, DP 自身が、メトヘモグロビンに対して還元的に作用することは、既に最初から 60~70% のメトヘモグロビンを含有した有した Hb 溶液に AP, DP を添加すると、メトヘモグロビンが減少し、これに対応して O<sub>2</sub>Hb が増加することから考えられる (Fig. 4)。(NO<sub>2</sub> はそれ自身で、酸化的にも、還元的にも作用する。但し、還元的に作用するのは、メト濃度が高い時においてである。) 従って、AP, 又は DP と Hb とを Incubation したとき、O<sub>2</sub> 吸収が未だ続いている時間にあっても、未酸化の AP, DP が残存している間は、メトヘモグロビンは一定のレベルに留まる。要するに、(O<sub>2</sub>Hb. + Met-Hb) 溶液の Redox Potential が、メトヘモグロビンが 60~70% 程度の時、AP または DP  $\rightleftharpoons$  Quinone 体、(NO<sub>2</sub>  $\rightleftharpoons$  NO<sub>3</sub>) の Redox Potential と平衡するのではないかと予測している。
- 6) 実際に、in vivo での知見を得るために、家兎耳静脈に静注 (なるべく赤血球と AP, DP 等を直接に作用させるため) し、直後から採血して、耳静脈中メトヘモグロビンの推移を観察した。これから分ったことは、① Meta 体は in vitro と同様、メトヘモグロビンを形成しない。② メトヘモグロビン濃度のピークは 10 分以内。③ o-AP は p-AP より (ときには、p-Benzoquinone, NO<sub>2</sub> より) 高いメト濃度を示す例があった。このことは、o-AP の Quinoneimine の生成度が、Hb の Oxidase 作用をうけると、p-AP (自酸化的には O-AP よりはるかに高い) より高くなることと符合するのではないかとと思われる。④ in vitro でメトを形成する DP が in vivo ではメトヘモグロビンを現わさなかった (Hydroquinone は in vitro では、かなり強いメトヘモグロビン Former であるに拘らず)。in vivo の実験は、たとえ静注であっても、透過性や抱合、解毒、還元等の諸因子が加わるので、現象の解析は、in vitro より一層複雑となる。  
おわりに、”AP, DP 等による Hb の Perturbation,” ということを、拡張して、”産業中毒物質、及び代謝物による酵素たん白の Perturbation,” というふうに理解するならば、慢性中毒の機序の研究 (産業中毒の機序の研究の中で、とくに難物視されている。) に一つのよりどころとなるのではないかと考えている。

#### 討論希望点

- 1) Hb の Oxidase の作用は、o-AP が基質であると同時に、Perturbator を兼ねるためとする考え方の是非。
- 2) それ自身には、酸化性を持たず、また、代謝もされないとと思われる条件、即ち、ヒト溶血液との Incubation で Nitrobenzene が約 15% (5 時間) 程度のメトヘモグロビンを作る。”Globin 経由の Fe 荷電の変化”の Case だとしても、どのような実験が、それを実証出来るのか?  
AP, DP の場合、Hb の Oxidase 作用の結果、生成した AP, DP の Quinone 体が Heme-Fe を酸化す



るのか？ それとも、Oxidase 作用の chemical Base と考えられる、AP, DP と Globin との結合が Globin 経由の Fe 荷電の変化をもたらすのか？

- 3) Met-Hb Former が異っても、メトヘモグロビンの630 $\mu$ , 500 $\mu$ の Density は等しいか？ あるいは異なるのか？
- 4) Williams. R. T. の新版 (p425) に、Met-Hb Former として free Radical,  $RN^+HO^-$ ,  $RN^{\cdot} \rightarrow O$  を紹介していること。

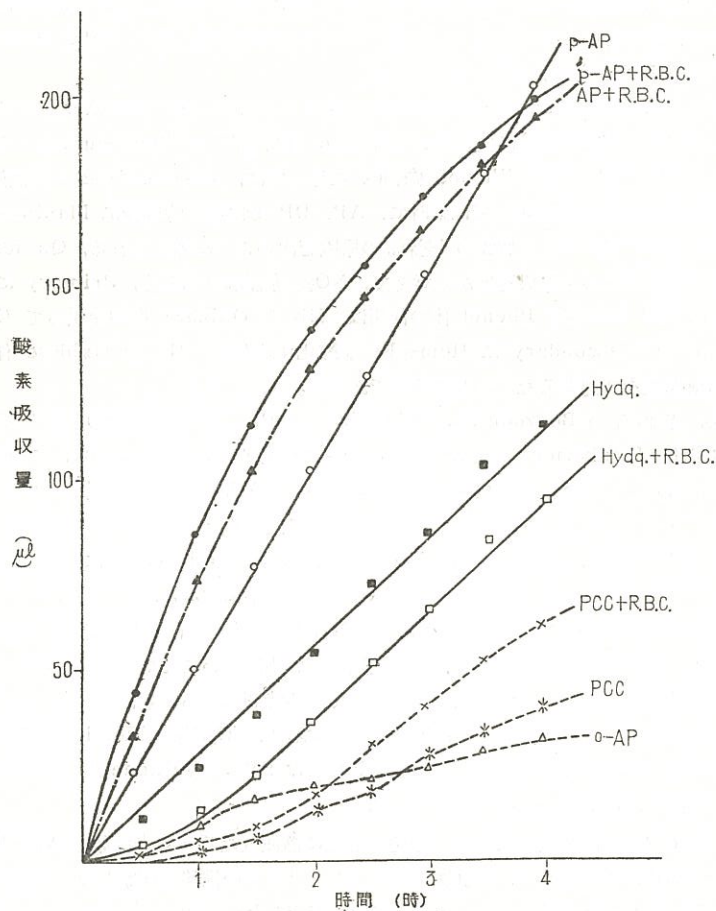


Fig. 1 Oxygen uptake of the mixture of the red blood cells with AP. and DP. Initial concentration of the agents; 5mM. Initial total Hb. concentration of the red blood cells; 0.5mM. Incubated at 38°C in the medium of M/15 phosphate buffer (pH 7.2). Total volume; 3.0ml.

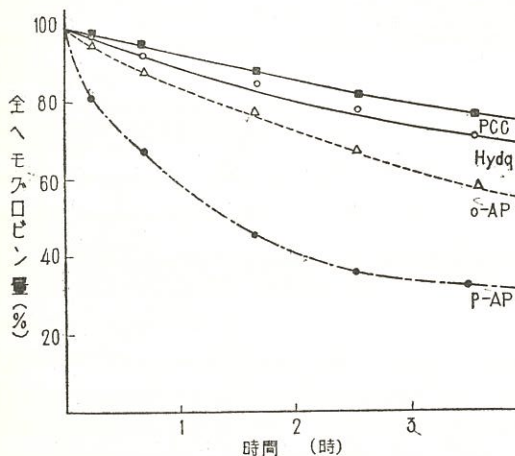


Fig. 2 Decreasing rate of the total Hb. Initial Concentration of the agents; 5mM. Initial Concentration of the total Hb. (human Hb.); 0.2 mM. Incubated at 38°C in the medium of M/15 phosphate buffer (PH 7.2). Each value was plotted as percentage to the initial value (=100%). The amount of the total Hb. was determined by the reduced Hb. method.

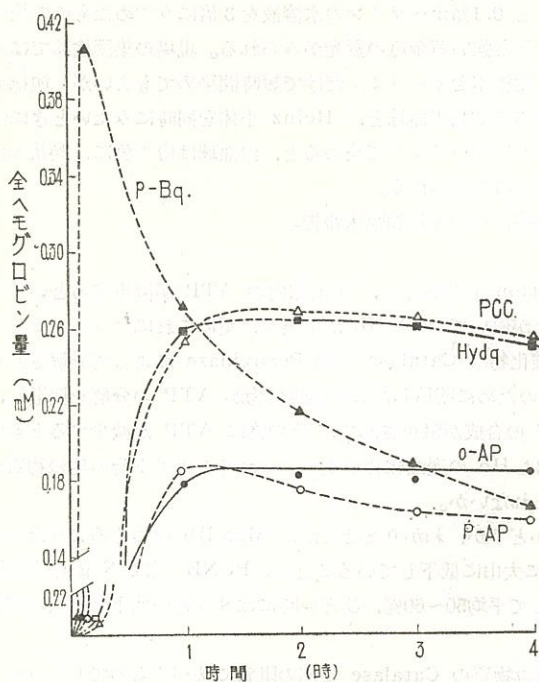
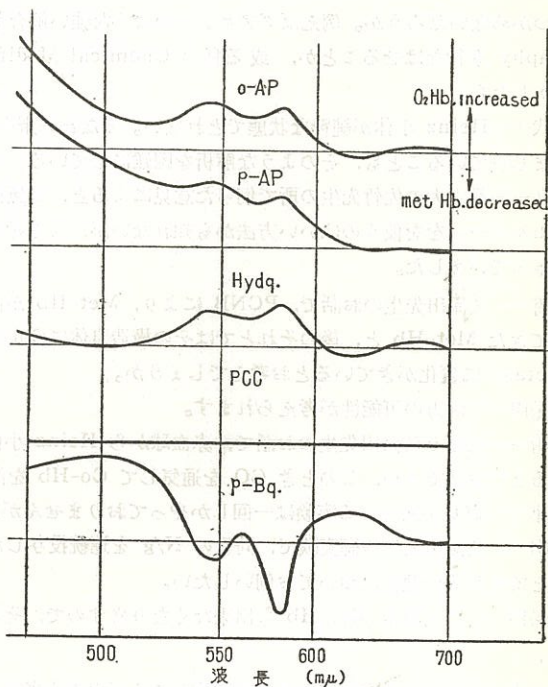


Fig. 3. Met-Hb. formation in the mixture of the human hemolysate with AP, DP and P-Bq. Initial concentration of the agents; 5mM. Total Hb.; 0.38mM in AP and DP, 0.42mM in p-Bq. Incubated at 38°C in the medium of M/15 phosphate buffer (PH 7.2).

Fig. 4. The compensative spectra of the mixture of the prepared Hb. with AP, DP and P-Bq. by Beckman Ratio Spectrophotometer. Initial concentration of the agents; 1mM. Incubated at 27°C for 20 min. in the medium of M/15 phosphate buffer (PH 6.8).



## 綜 合 討 論 (Ⅲ)

座長 上 代 皓 三 教授

(日本医大・生化)

小机(慈恵・公衛)——私共の所で蛍光染色の種々な応用についてやっているが、例えば結核菌を5%フェノールと0.1%オーラミンの水溶液を3倍にうすめたもので染めると強い黄金色の蛍光がみられる。現場の集団検診では固定標本をオーラミンだけで短時間染めてもよいが、塗抹標本で網状赤血球と、Heinz 小体を同時にみたいときには

アクリヂンオレンジで数秒そめ、ついで1~2秒フェノール・オーラミンで染めると、白血球は橙々色に、網状赤血球は赤橙色に、また Heinz body は黄色に、はっきりと染め分けられる。

佐々木(福島労災)——自家中毒性のメトヘモグロビン血症について追加臨床報告。

### Heinz 小体に関する討論

中尾——モラーは赤血球とフェニルヒドラジンを Incubation しておく、赤血球内の ATP が減少するという事実を見出し、その機構として、Hb にフェニルヒドラジンが働いて Met-Hb が生成し、更にこれにフェニルヒドラジンが働いて或る種の過酸化物が生ずる。通常はこの過酸化物は Catalase 又は Peroxidase によって分解されるが、フェニルヒドラジンは Catalase 作用を阻害し、そのために蓄積したこの過酸化物が ATP の分解を促進し、ATP が減少するものと考えているが、実はこの際 APT の合成が阻止されて、その為に ATP が減少するとも解釈出来る。さて一方、この過酸化物により、Met-Hb 又は Hb の過酸化物が生じ、これにリポイドその他の物質が関与して、最終的に Heinz 小体が出来てくるとは考えられないか。

長谷川——中尾先生のお考えを支持するデータになるかどうか、わかりませんが、Met-Hb をつくるような中毒のときに、奇妙なことに、血液の Catalase 活性は非常に大巾に低下していることが、PCNB 又は N/g 中毒の際にみとめられております。すなわちその活性は正常に比して平均50~60%、ひどい時には8%近い低下が私共の実験でたしかめられております。

米山——そのような Catalase 活性の低下は、或る種の有毒物質の Catalase 反応の阻害に基づくものでしょうか。又は何か他の原因による活性の低下でしょうか。

長谷川——PCNB 中毒の場合は Catalase の絶対量が減少したような感じをうけますが、N/g 中毒の場合は(火薬製造工場の従業員の場合も)明かに Catalase が阻害されたことによる活性の低下であることが確められております。

木村——Heinz 小体の物質組成を、例えば蛋白化学的な見方で解析していったら、Heinz 小体の生因を知る手掛りが見つめないだろうか。例えばグアニジンのような強い解合剤を用いて、その Solvent 中で Column Chromatography を行なはせることか、或る種の Chemical Modification をしてのちに Chromatography を行はせるとかしたら。

上代——Heinz 小体が純粋な状態でとれない。すなわち蛋白の関与は明かであるがいろいろな状態の Heinz 小体がまじっていることも、そのような解析を困難にしている。

中島——都立大の佐竹先生の所で同った意見によると、電気泳動で分析するには電荷の大巾な変化が必要である。一方セルローズを使うのはいい方法かも知れないが、よく考えた上でしなければならぬ、充分検討した上でおっしゃっていました。

岡崎——久保田先生のお話で、PCNB により、Met-Hb が出来る場合2つの段階があるということですが、最初出来てきた Met-Hb と、後のそれとではその構造自体に変化が生じているとお考えでしょうか。又は Met-Hb Reductase に変化がきているとお考えでしょうか。

久保田——両方の可能性が考えられます。

岡崎——矢張り久保田先生のお話で、赤血球から Heinz 小体を除き、これを放置すると再び Heinz 小体が出来てくるとのお話ですが、このとき CO を通気して Co-Hb を作ってやっても、同様な現象がみられるでしょうか。

石津——CO を通気する実験は一回しかやっておりませんが、CO 通気により赤血球は溶血してしまいました。

新山——久保田先生の御実験で、同量の N/g を連続投与したとき、Heinz 小体が減少してくることがみられるとのことですがその理由について伺いたい。

久保田——この場合 Met-Hb も出来なくなりますので、その結果 Heinz 小体が減少してくるものと考えられます。

長谷川——そのような事実をよく説明することが出来る事実を私共の所で持っております。N/g は体内で  $\text{NO}_3$  に分解されますが、N/g を与えつづけると、N/g を  $\text{NO}_3$  にする能力は次第に増加して来ます。一方 N/g 中毒において生成する Met-Hb は N/g そのものによって生ずることがたしかめられておりますので、この2つの事実考え

合わせると、久保田先生の観察された事実はよく説明されると思います。

久保田——N/g 以外のもの、例えば PCNB 等のときにも、そのようなことが云えるでしょうか。

長谷川——N/g 以外については実験しておりません。

上代(座長) 有毒物質による Met-Hb 生成の作用機作についての討論をしたいと存じます。ここで問題を2つに分けて

1. 直接に Hb に働いて Met-Hb が出来る試験管内反応
2. 赤血球酵素系の障害

についてそれぞれ別個に討論したいと存じます。まず1の問題について。

小倉(東大・理・生物化学)——芳香族化合物が Hb 分子に働いて Met-Hb が出来るとき、赤血塩が Hb に働いて直接ヘムの  $Fe^{++}$  を  $Fe^{+++}$  にする場合とは、その機作は全く異なるものと考えられる。芳香族化合物の場合  $O_2$  の有無が Met-Hb の生成に関係するから、その作用機作を知るために次のような実験をしたらよいのではないかと。すなわち  $Cl \left\langle \begin{array}{c} \diagup \quad \diagdown \\ \square \end{array} \right\rangle NHOH$  を anaerobic State で Hb に働かせ、ついで anaerobic State で透析した後、空气中に放置したときの Met-Hb 生速度と、何等の処理もしない Hb が空气中で Met-Hb になる速度を比較した場合恐らく前者の方が、より大きいものと考えられる。もしそうならば芳香族化合物は Hb の蛋白部分に作用して、何等かの変性をおこさせ、それが  $O_2$  の存在によって、Met-Hb になるものと考えられる。

吉田——有益な御教示につきまして、よく考えてみたいと存じます。

岡崎——私共の教室で、種々の Perturbator と Hb の相互作用について調べておりますが、Hb は Perturbation によって Oxidase 活性が上がり、スペクトルに変化が生じるような時には逆に Oxidase 活性は低下してくることが確かめられています。Aminophenol が低い濃度で加えられたとき、 $O_2$ -Uptake から Perturbation の状態をうかがうことが出来ないでしょうか。

中島——Aminophenol の濃度と、 $O_2$ -Uptake との関係をしらべてみましたが、Aminophenol 濃度があがるにつれて、 $O_2$ -Uptake は増大しておりました。従って Perturbation と  $O_2$ -Uptake との関係は、はっきりいたしません。なお Nitrobenzol では、Hb と Incubation した後、アスコルビン酸を加えると、 $O_2$ -Uptake は増大し、又 Met-Hb の生成もみとめられました。この場合には Nitrobenzol による Perturbation の度合いが、はっきり測定されると思います。

ここで Aminophenol, p-Benzoquinone 等により、Perturbation がおこっているときの Met-Hb の測定法の問題に入り、一般的な Met-Hb の簡単な測定法が、上代、岡崎両氏により提示された。

岡崎——オタマジャクシの Met-Hb (但し、 $HbO_2$  と Met-Hb の2成分系について) 量を簡単に測定するには次のようにしたらよい。 $HbO_2$  に CO を通気すると  $HbCO$  になる。従って問題は  $HbCO$  と Met-Hb の両者を含む系について測定を行えばよいことになる。Soret 帯における  $COHb$  (max:  $418.5m\mu$ ) と Met-Hb (max:  $405m\mu$ ) の isobestic Point は  $412m\mu$  にある。すなわち Met-Hb と  $O_2Hb$  の混在物に CO を通気すると  $CO$ -Met-Hb の混在物にかわる。一方 Hydrosulfite で完全に還元して CO を通気するか、又は赤血塩で酸化すれば、完全な  $CO$ -Hb 又は Met-Hb の  $r$  帯の極大の光吸収値が得られる。これと種々な混在比の  $\epsilon_{415}/412$  又は  $\epsilon_{405}/512$  とのノモグラムを作製しておけば、試料中の Met-Hb の混在量は簡単に求められる。尚この測定法の精度、応用等については検討の余地がある。

上代(座長)——Met-Hb Reductase 或いは TPNH-generating System のようなものが、Met-Hb 形成毒の影響をうけて、そのために Met-Hb の還元がおこらないというような事実又は経験について話して頂きたい。

中島——Diaphorase が Met-Hb を還元するという報告がありますが、勿論この酵素は Met-Hb に特異的でない。中尾先生にお伺いしたいのですが、先程先生のお話の中で、Reductase に関連して Coenzyme Q のお話がありました。

中尾——この Reductase には2ヶの Prosthetic Group が含まれ、その1は heme であり、他は Coenzyme Q であるといわれていますが、基質特異性の詳しい報告はまだありません。なお例えば G-6-P-Dehydrogenase 活性が、先天的又は後天的に低いとき、Met-Hb の出来方はどうなっているのでしょうか。

上代(座長)——この問題については、今後の研究の発展にまちたいと存じます。

## 8. ニトログリコール (N/g) 及び p-クロロトロボンゼン (PCNB) 中毒におけるヘモグロビンの生理的機能の変化について

長谷川 弘道 佐藤 光男  
(労働省労働衛生研究所)

親和性に変化がみられるのではないだろうか、こう考えて N/g 又は PCNB を兎に皮下注射して、実験的に中毒をおこさせ、その際にみられる Hb の酸素親和性を、Met-Hb の生成と併せて観察した。

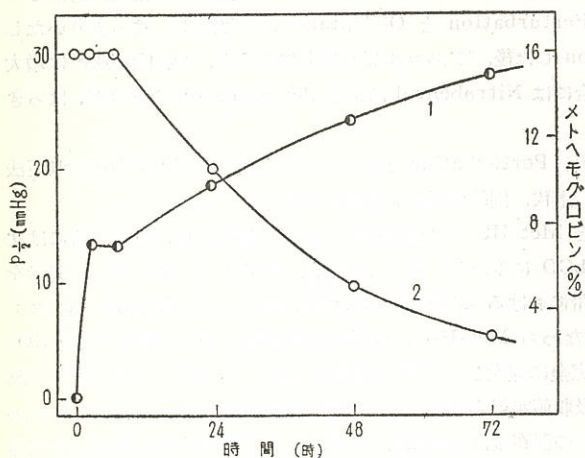
### 1. PCNB 中毒について

家兎に体重 1 kg 当り 0.5g の PCNB をゴマ油に懸濁させた状態で皮下注射すると、注射直後から Met-Hb の生成がみられ、2 時間目には 8% に達する、以後 6 時間目まで変化なく、それ以後徐々に Met-Hb が生成され 72 時間目には 16% に達する。(第 1 図、曲線 1)。このように Met-Hb の生成過程に 2 つの段階がみられることに対して久保田、石津氏等は Met-Hb 自身に Hb に還元され難い構造上の変化が、おこったものと説明している。

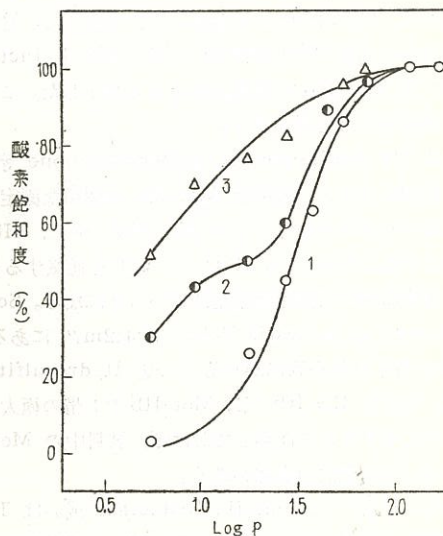
この Met-Hb の生成量の測定と同時に、Hb の酸素親和性を Wyman の方法に準じて、種々の気圧下において、測定したところ、一般に

$$Y (\text{酸素飽和度}) = \frac{Lp^n}{1 + Lp^n}$$

であらわされる n の値は pH 6.8, 0°C で、注射前には 2.8 であることがわかった。しかし PCNB 投与後では、酸素飽和曲線は非常に複雑になり、酸素圧の低いところで大巾な酸素親和性の増大がみられるに反して、酸素圧の高いところでは、親和性はあまり変化していなかった (第 2 図)。このため飽和曲線は単純に 1 個の n の値では表現されない。



第 1 図 兎に PCNB (0.5g/kg 体重) を投与した時にみられる Met-Hb (1) 及び Hb の酸素親和性(2)の時間的变化。



第 2 図 PCNB(0.5g/kg 体重) を投与した兎の溶血液の酸素親和性の変化, pH6.8, 30°C.

1: 投与前, 2: 投与24時間後,  
3: 投与72時間後。

しかし注射後72時間目には  $n=1$  としたときの理論曲線に極めて近い測定点が得られた。 $n=2.8$  という値はよく知られているように Hb 分子の 4 個のヘム間に強い相互作用があることを示すものであるが、もしこの 4 個のヘム間の相互作用がないと、各ヘムは各々独立に酸素分子と結合することになり、当然  $n$  の値は 1 になる。一方このように酸素親和性が大巾に増大したときの Hb の可視部の吸収スペクトルは正常な Hb のそれと比較して全く差がみとめられないことから、PCNB 又はその代謝物は Hb 分子の蛋白部分に作用して 4 個のヘム間の相互作用を切断する作用があるものと考えられる。

ここで問題になるのは 4 個のヘムのうち 1 つ、2 つ或は 3 つが Met- 型になつたとき残ったヘムの酸素親和性が、

どのような影響をうけるかということである。これに関しては Roughton 等の古い実験があるが、我々も赤血塩を酸化剤として、Met-Hb 量と酸素飽和曲線との関係をしらべてみた。するとこの場合にも酸素親和性の増大がみられ、Met-Hb 量がまずに従って飽和曲線が左にずれることが観察されたが、PCNB を投与したときと異なり、きれいな Sigmoid 曲線で表わされ、且 Met-Hb 量が18%程度では、Met-Hb のないときと殆んど変らなかった。従って第2図にみられる PCNB 投与時の酸素飽和曲線の変化はすべて PCNB 又はその代謝物が Hb の蛋白部分に結合したために生じたものであると考えてさしつかえないことが判った。

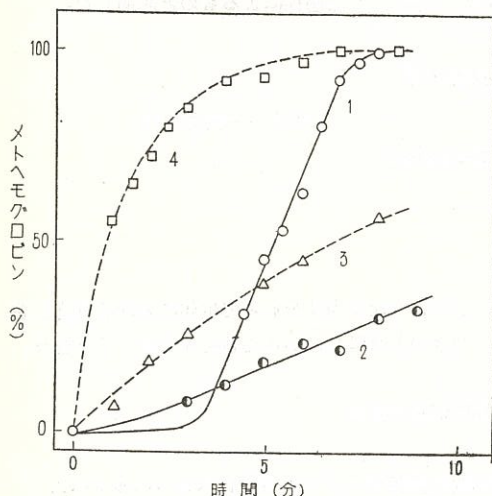
Hb の酸素親和性を表わす手段として一般に  $p_{50}$  (Hb の半分が酸素で飽和されるに必要な圧力) が用いられるが PCNB 中毒の場合には曲線がきれいな Sigmoid 曲線で表わされないことから  $p_{50}$  の値で親和性の変化をあらわすには一寸問題であるが、ここでは一応これを使うことにする。その結果は第1図の曲線2にみられるように PCNB 投与後6時間目までは変化はないが、それ以後急激に低下するのがみとめられる。こうした酸素親和性の増大から当然生体の末端組織では、Hb からの酸素の放出がおこり難くなっていると考えられるので、動脈血及び静脈血に含まれる酸素量を測定したところ、両者の比の値は正常時には0.55であったのに PCNB 投与72時間目には0.80となり、PCNB中毒時の末端組織への酸素供給量は正常時の40%にすぎないことが見出された。しかし PCNB 投与後72時間目に採血した血液から Hb を結晶化し、充分水に対して透析しても、その酸素解離曲線は全血について行った時と変わらないことから Hb 分子と PCNB 又はその代謝物との結合は不可逆的であるか又は非常に強いことが考えられる。

## 2. N/g 中毒について

兎に体重1kg 当り 0.3g の N/g を連日皮下注射すると、2日目位からハイツ小体の形成が認められるが、もっと激しい変化として Met-Hb の形成が認められた。N/g 投与後2時間目には全 Hb の40%が Met-Hb に変化し、24時間目には完全に消失する。第2回、第3回目の N/g 投与時にも同様の経過が観察された。

こうした Met-Hb が何によって惹起されるのかを確かめるために *in vitro* で、兎の溶血液に N/g 及びニトログリセリンの場合に血液中に検出されている  $\text{NO}_2^-$  をそれぞれ加え 630m $\mu$  の光吸収の増加から、Met-Hb の生成を追跡した(第3図)。0.57mM の  $\text{NO}_2^-$  を加えると、約3分間は光吸収に変化なく、つづいて急激な光吸収の増加がみられます。1mmHg 気中では Met-Hb 生成速度は空気中の約 $\frac{1}{3}$ に減少する。

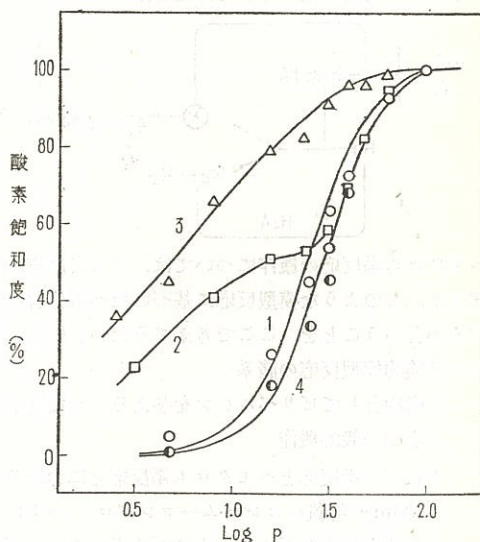
N/g の場合には 0.57mM では殆んど Met-Hb の形成はみられず、4.3mM では加えた直後から Met-Hb が形成され、全部が Met-Hb にかわるのに約60分を必要とした。又 1mmHg 気中ではその生成速度は約10倍に達し、5分で完全に Met-Hb になる。恐らく N/g と  $\text{NO}_2^-$  では Hb を Met-Hb にかえる機構は全く異なるものと考えてよいであろう。N/g を与えた兎の血液に  $\text{NO}_2^-$  は全く検出されないことから、この場合の Met-Hb は N/g によって生成するものと考えられる。



第3図 兎の溶血液に  $\text{N}_2\text{O}^-$  又は N/g を添加した時に生成する Met-Hb 量の時間的推移

- 1 : 0.57mM  $\text{NO}_2^-$  (760mmHg)
- 2 : 0.57mM  $\text{NO}_2^-$  (1mmHg)
- 3 : 4.3mM N/g (760mmHg)
- 4 : 4.3mM N/g (1mmHg)

pH 6.8, 30°C.



第4図 N/g(0.3g/kg 体重)を投与した兎の溶血液の酸素親和性の変化

- 1 : N/g 投与前, 2 : N/g 投与2時間後,
- 3 : 6時間後, 4 : 24時間後,

pH 6.8, 30°C.

次に Hb の酸素親和性に及ぼす N/g の影響を調べたところ、その酸素飽和曲線は PCNB 中毒にみられたと同様に N/g を投与して 4~6 時間目には  $n=1$  としたときの理論値に極めて近い測定点が得られた(第 4 図)。この場合には Met-Hb の生成量が大いので、PCNB 中毒の場合とは異なり Met-Hb 形成による Hb の酸素親和性の増加が当然考えられるが、Met-Hb の量 30~40% で実際に測定された  $n=1$  という値は理論上 Hb の 75% が Met-Hb になっていることを意味しているので、Met-Hb の形成による影響を上まわった変化が Ng 中毒にかかった兎の Hb に生じていることになる。

これを証明する事実として、次のような事実が観察された。某ニトログリコール製造工場の労働者 30 名について調べた結果、正常者の  $pO_2 \frac{1}{2}$  の値 3.66 (pH 6.8, 30°) に対して、一般に労働者では低下しており 2.8 位のものが数例みられたが、Met-Hb 量は正常者と変化なかった。又兎の Hb 溶液を一定圧力下において、Met-Hb の生成のおこらない程度のうすい N/g を添加すると、吸光度は変化し HbO<sub>2</sub> 量の増加が観察された。

$p \frac{1}{2}$  の値は N/g 投与により大巾に減少するがしかし 24 時間目には正常値を通りこして増加する(第 3 図曲線 2)。この経過は第 2 回目、第 3 回目の N/g 投与時にも観察された。ここで N/g 投与を 1 日休んで 5 日目に第 4 回目の N/g を与えると、今迄と非常に異った結果が得られた。すなわち  $p \frac{1}{2}$  の値は短時間に激しい増減を繰返した。今迄報告されたところでは N/g 取扱場で休日後に死亡者が多いところから俗に月曜病と呼ばれている N/g 中毒を上記の  $p \frac{1}{2}$  の激しい増減と対比して考えたとき、まことに興味ある現象である。

なお N/g 投与した兎の動脈血と静脈血に含まれる酸素量の比の値は N/g 投与前には 0.44 であったが、0.3g の N/g 投与 3 時間目には 0.62, 5 時間目には 0.83 となり、末端組織への酸素供給状態は非常に悪化していた。

## 9. ヘモグロビンの崩壊機序に関して

上代 皓三

(日本医科大学生生化学教室)

われわれは、いろいろの試験管的模型反応の研究結果から、ヘモグロビンの分解によるビリベルジンの形成は、つぎのような過程によると推定している。

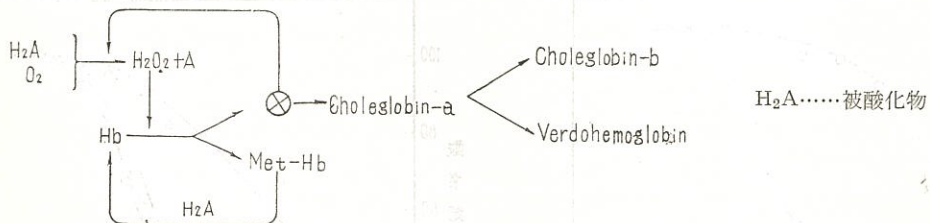
A: ヘモクロム系反応

ビリジンヘモクロム → 630m $\mu$  物質 → ビリジンペルドヘモクロム → ビリベルジン

B: グロビン系反応

酸素ヘモグロビン → コレグロビン → ペルドヘモグロビン → ビリベルジン

そしてこの反応の機作として、たとえばヘモグロビンの場合には、つぎのような過程によるものと説明した。



ヘモクロム系反応の機作については、ここでは省略する。

演者は、このような模型反応に基づいたヘム分解機作の説明が、どのような妥当性をもって生体における反応を説明するかということ、ここで考えてみたいと思う。そのために、つぎの項目にしたがって話をすすめようと思う。

### 1) 試験的模型反応の諸系

終産物としてビリベルジンを与えるような反応系および関連反応系の研究

### 2) 反応の一般的機作

### 3) グロビン系反応とヘモクロム系反応におけるヘム部変化の対応関係

630m $\mu$  物質 ← コレヘム → コレグロビンペルド

ヘモクロム ← ペルドヘム → ペルドヘモグロビン

### 4) 生体におけるコレグロビンおよびペルドヘモグロビンの形成

### 5) ヘモグロビンの機能の変化とヘモグロビン分解反応との関連

以上の論述を、産業中毒の問題に直接関連づけることは稍困難と思われるが、基本的な立場から一応の問題点を考察してみたい。

## 綜 合 討 論 (IV)

座長 小倉安之教授 (東大理生化)

ことはなかったか。又実験条件についてお伺いしたい。

長谷川——実験はすべて PH6.8, 30°C で行いました。又 Met-Hb 量は実験前後で変化していないことが確かめられております。なお, N/g の場合には in vitro で, Met-Hb をつくらないよううすい濃度の N/g を ( $10^{-4}M$ ) 加えて, 酸素平衡をしらべますと, 明らかに酸素親和性の増大がみとめられました。

岡崎——PCNB 中毒家兎の Hb を結晶化し, 再結後, 水にとかして透析した後でも, 酸素平衡曲線は全血(溶血液)について行った場合と, 変らないことから PCNB の代謝物が, 可成り緊く Hb の蛋白部分に結合しているのではないかと推定されておりますが, その場合スペクトルの変化はおこらないでしょうか。

長谷川——中毒家兎から結晶化した Hb は可成りの量の Met-Hb を含んでおります。そこでこの混合物の示す光吸収スペクトルから Met-Hb とともに光吸収を差引けば,  $O_2Hb$  のみの光吸収スペクトルが得られます。これを正常家兎から得られた結晶 Hb のスペクトルと比較いたしますと, 両者の間には差は認められませんでした。従って酸素に対する Affinity は変わってもスペクトルは変化しておりませんでした。なお蛋白部分にこうした中毒物質が結合しても必ずしもスペクトルの変化はおこらないことは, 小倉先生の実験された Catalase と Phenol 類の結合 (Phenol 類は Imidazol 基に結合して Catalase 反応を阻害する) の場合にも, いわれております。(註, これについてはいづれ詳しく報告します。)

小倉——勿論 1 分子に沢山つけばスペクトルの変化はおこるでしょうが, 1~2 ケでは, 可視部のスペクトルはたとえ変化したとしても僅かで, 測定出来ないのではないのでしょうか。蛋白部分にもとづく吸収帯 280m $\mu$  近辺で, その結合物質の光吸収がないようなものでは, もし 280m $\mu$  近辺にスペクトルの変化がおこれば, 結合したことがはっきりわかると思います。

岡崎——赤血塩を Hb 溶液に加えて, Met-Hb と  $O_2Hb$  の混合物をつくり, その酸素平衡をしらべられた実験についてお伺いしたい。Met-Hb の出来方として, Hb の 4 ケのへムの一部が酸化されて,  $Fe^{++}$  と  $Fe^{+++}$  の両方の Type のへムを含んだ Hb が出来る場合と, 4 ケのへムがすべて  $Fe^{+++}$  になり, 結果として 4 ケのへムがすべて  $Fe^{+++}$  であるか, 又はすべて  $Fe^{++}$  であるかという 2 通りの Met-Hb の出来方が考えられますが, 長谷川先生の実験で, Met-Hb 量が増大するにつれて,  $O_2$  親和性が増大し, それに伴って Sigmoid の次数が減少していくことから考えますと, 1 分子中に  $Fe^{++}$  のものと,  $Fe^{+++}$  のものの両者が混在する可能性が (赤血塩の場合) 確かなように思われますが, そのとき, Met-Hb 量がまずと最後には n の次数は 1 まで減少しましたでしょうか。

長谷川——この実験では Met-Hb 量は 65 %位までしかやっておりますが, その範囲内では Sigmoid の次数は Met-Hb 量と平衡して, 2.8 から減少しておりました。Met-Hb 量が 75 %位では加える赤血塩量の僅かの変動が, Met-Hb 生成量に大きく影響し, 又一方  $O_2$  に対する親和性をもったヘモグロビン量のごく僅かになり, Hb  $\rightarrow$  Hb $O_2$  に対応する光吸収の変化が僅かになり, 非常に実験し難くなります。なお後で気がついたのですが, Rough-ton も同様の実験を赤血塩を使ってやっておりますが, 彼の場合は p-Y 関係でだしておりますので, まだ log p-Y 関係に換算してありませんが, きれいな Sigmoid の変化としてあらわされるように思いました。

上代——別々に調整しておいた Met-Hb と  $O_2Hb$  をまぜたとき, この系の酸素平衡曲線はどうなりますか。

長谷川——この場合には, 全く Met-Hb の影響はなく, このことは他の人達によっても実証されております。

小倉——直接へムの  $Fe^{++}$  を攻撃して,  $Fe^{+++}$  にするようなもの, 例えば血塩等では 1 分子中に  $Fe^{++}$  と  $Fe^{+++}$  が混在するし, 直接へムの  $Fe^{++}$  を攻撃しないものでは, 4 ケのへムがすべて  $Fe^{++}$  のものとすべて  $Fe^{++}$  のものとのまじりが出来るのではないか。すなわち酸素平衡曲線のズレは全く N/g の影響をうけないものそのままのものと, N/g の影響をうけて 4 ケのへム間の相互作用の全く消失したものと両者のまじりとして説明出来ないか。

岡崎——X線を動物に照射した場合ですが, 長谷川先生の pCNB 中毒におけるような変化が, Hb と Ethyl-Isoeyanate の結合においてみられました。ここで, 小倉先生のおっしゃられたような, へム間の相互作用の全くなくなったものと, 完全にもとのままのものとの混在として, 両者の比を適当に与えて 2 つの Sigmoid を合成することにより, 実験結果をよく説明することが出来ました。

長谷川——小倉先生の説で説明出来ます。なお, 赤血塩の場合の, 1 分子中に  $Fe^{++}$  と  $Fe^{+++}$  が混在するときの酸素平衡曲線を説明する式を, 当研究所の左右田先生と一緒に考えてはいますが, この実験によくあてはまる式はまだ



みつかっておりません。

—なお N/g の影響として Hb 分子の 4 ヶのヘム間の相互作用を切断する働もさることながら、N/g 投与 24 時間後には正常なものよりも、酸素親和性は低下しております。N/g の作用としてこの両方を説明するのに目下非常に困っております。

小倉—SH 阻害剤例えば PCMB を Hb に加えたとき、酸素平衡はどうなりますか。

上代、岡崎—Riggs がこの実験をやっておりますが、PCMB はヘム間の相互作用をなくし、酸素親和性の増大がみられると報告しております。しかし比較生化学的に種々の Hb について PCMB の作用をみた場合必ずしも PCMB によって酸素平衡が乱されないものもあります。

註 (長谷川) PCNB 中毒家兎より得られた結晶 Hb について、SH 基の定量を行ったが、正常なものとの差はみられなかった。

中島—上代先生のお話しの中で出てきた Configuration と Perturbation の関係についてお伺いしたい。

上代—Perturbation がおきたとき、実際に Configuration に変化がきたかどうかを事実から説明するのは困難ですが、観念的には次のように考えられます。Perturbation は Hb の分子構造がゆるむという状態をさすもので、このとき Oxidase 作用は高揚する。そして Configuration に変化がおきれば、Oxidase 作用はなくなる。

中島—Hb 分子のヘム近傍の 2 次 3 次構造は特に Compact な状態にあると考えられているが、Myoglobin の場合にもそう考えてよいでしょうか。

上代—Myoglobin の場合にはそうした特殊性は考えられない。というのは Bohr Effect がないから。

中島—ヘム間の相互作用を内部エネルギーから考えている人があるが。

上代—Roughton 達が 20 年近くもこの問題を考えているが、仲々困難なようです。

楠本(大阪労研)—Hb の分解過程にあらわれる Hb-X の Fe の電荷は 2 価でしょうか。3 価でしょうか。

上代—Hb が Perturbation によって、Oxidase 作用があがったときの状態が Hb-X に相当するわけですが、Fe が 2 価であるが、又は 3 価であるかの確証はございません。

長谷川—私共の所で近頃 Detergent を使って、その Hb に対する影響をみたところ、相当うすい濃度で、Hb のスペクトルが可逆的に変化することをみておりますが、上代先生の所で、Detergent の Hb に対する Effect をみられた御経験はございませんか。

上代—これは非常に面白い問題でして私共の所でもいろいろな Detergent の Hb に対する作用をしらべておりますが、特にオレイン酸ソーダは極く低濃度 (1 : 1 位) でスペクトルに変化をおこし、これは透析によって除くことが出来ます。

# 労働省労働衛生研究報告

第七号 補冊1

開所五周年記念

## 産業中毒におけるヘモグロビンの 変化を中心としての討論会

於労働衛生研究所

### 内 容 目 次

1. 正常時とベンゼン中毒時の骨髄デオキシリボ核酸の比較 ……………木村正己…(1)
2. ポルフィリン代謝 ——特に鉛中毒を中心として—— ……………佐野晴洋…(5)
3. ヘモグロビンの生合成について ……………米山良昌…(10)  
    綜合討論 (I) ……………座長 久保田重孝…(12)
4. 赤血球の細胞生化学 ……………中尾真…(14)  
    綜合討論 (II) ……………座長 米山良昌…(15)
5. ハイソツ小体について ……………久保田重孝、石津澄子…(16)
6. メトヘモグロビン形成 ——特にPCNBに関連して—— ……………吉田克己、山浦熒子…(19)
7. アミノフェノール、ヂフェノールによるメトヘモグロン  
    形成機序について ……………中島泰知、楠本繁子…(20)  
    綜合討論 (III) ……………座長 上代皓三…(24)
8. ニトログリコール及びPCNB中毒におけるヘモグロビンの  
    生理的機能の変化について ……………長谷川弘道、佐藤光男…(26)
9. ヘモグロビンの崩壊機序に関して ……………上代皓三…(28)  
    綜合討論 (IV) ……………座長 小倉安之…(29)