

亜硝酸イオンによる正常およびアカタラセミアマウス 溶血液のメトヘモグロビン生成の差異について

岡山大学医学部公衆衛生学教室 (指導: 緒方正名教授)

井 奥 尚 也

(昭和62年2月25日受稿)

Key words: 亜硝酸イオン
カタラーゼ
メトヘモグロビン

緒 言

我が国の大気汚染で工場の固定発生源による硫黄酸化物(SO_x), 窒素酸化物(NO_x)に対して, 近年は移動発生源によるNO_xの大気汚染が深刻化している。

固定発生源による大気汚染については, Shy¹⁾らによりニトロトルエン工場近辺において急性呼吸器疾患罹患率の高いことが指摘されている。移動発生源による大気汚染では, 上気道において咳が多いが, その他, 二酸化窒素(NO₂)による暴露では, 上記の他に血液の変化としてメトヘモグロビン血症が知られている。高濃度の亜硝酸イオン²⁾あるいは一酸化窒素ガス³⁾(NO)や二酸化窒素ガス(NO₂)⁴⁾によりメトヘモグロビンが生成することが報告されているが, その生成機構は, なお不明な点が多い。NO₂は水に溶解すると, 硝酸と亜硝酸となる(2NO₂+H₂O→HNO₃+HNO₂)。亜硝酸塩は単離した赤血球に対してメトヘモグロビン形成作用をもつが, この際, 過酸化水素の発生を伴うと言われている⁵⁾。その際発生した微量の過酸化水素によってメトヘモグロビン化が繰り返し起こるかどうかはまだ十分にわかっていない。しかし自酸化によるメトヘモグロビンの増加に関しては, 過酸化水素が関係している⁶⁾。そして, 亜硝酸イオンによりヘモグロビンからメトヘモグロビンの生成に対してカタラーゼの添加が抑制的にはたらくことが報告されている⁷⁾。そのほか亜硝酸イオ

ンの経口摂取に関して, 谷口・河田^{8,9)}は, 摂取された硝酸イオンが口腔内常在菌により還元代謝され, かなりの亜硝酸イオンが作られることを述べている。また, その亜硝酸イオンと各級アミン化合物とにより発癌性ニトロソアミン化合物を形成することを述べている。この事実は, 又亜硝酸イオンの消化管吸収の可能性を示すものと考える。

今回, 我々は正常およびアカタラセミアマウスの溶血液に亜硝酸ソーダを添加後, 亜硝酸イオンによるメトヘモグロビンの生成量を比較検討したので報告する。

実験材料および実験方法

4~6週齢, 体重25~33gの雄正常マウス(C₃H/AnL C₅₇Bl/C₆₀), 雄アカタラセミアマウス(C₃H/AnL C₅₇Bl/C₆₀^{ts})を用いた。

1. 溶血液の調整

両種マウスより約1mlずつ数匹採血し, それぞれ5倍量の生理食塩水で5回洗浄して赤血球を得る。この赤血球を約10倍量の蒸留水で溶血した後, 10,000rpmで60分間遠心分離してゴーストを除去し溶血液の試料とした。この溶血液より後述の方法でカタラーゼおよびヘモグロビン量を測定した。そして, 正常およびアカタラセミアマウスの溶血液は, 1/10M pH 6.8のリン酸緩衝液を用い, それぞれ約0.4mg Hb/mlとなる様調整した。

2. 亜硝酸ソーダによる両種マウス溶血液のメ

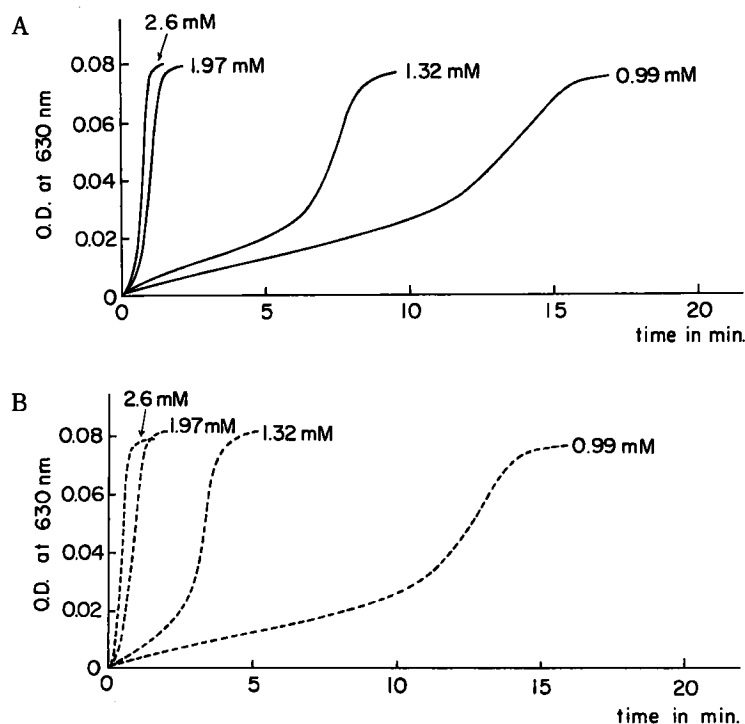


Fig. 1 (A, B) Methemoglobin formation from hemoglobin in the hemolysates of normal (Fig. 1 A) and acatalasemic (Fig. 1 B) mice by nitrite ion in the ranged from 0.99 to 2.60 mM (Final concentration) as time lapse.

トヘモグロビン生成の測定

0.4 mgHb/ml に調整した正常及びアカタラセミアマウス溶血液を 1 cm ガラスセルに採り、分光光度計にセットする。これに亜硝酸ソーダ水溶液を添加し、すばやく攪拌し反応開始とした。この時、生成されるメトヘモグロビンを 37°C、630 nm における吸光度の増加とし反応時間との関係を経時的に記録した。

添加する亜硝酸ソーダは、反応液中の終濃度を 0.99 mM, 1.32 mM, 1.97 mM, 2.60 mM とする様にした。

3. カタラーゼ活性度の測定

Feinstein の過ホウ素酸法¹⁰⁾により 37°C の条件下で両種マウスの溶血液についてカタラーゼの活性度を定量した。活性度は過ホウ素酸塩一単位 (Perborate unit) で表わした。

4. ヘモグロビン量およびメトヘモグロビン濃度の測定

Van Kampen 法¹¹⁾の改良法を用い、測定し

た。分光光度計、記録計は日立製 (100-60 型, 056 型) を使用した。

実験成績

1. 溶血液のカタラーゼ活性度

今回使用した溶血液のヘモグロビン 1 g あたりのカタラーゼ量は、正常マウス 1022 ± 127.9 pu/gHb (m \pm SD), アカタラセミアマウス 122 ± 17.8 pu/gHb であり、正常マウスはアカタラセミアマウスの約 9 倍のカタラーゼ量を示した。

2. 亜硝酸ソーダ添加後のメトヘモグロビン生成の経時的变化

図 1 A, B において、横軸には時間 (分) を、縦軸には 37°C の 630 nm における吸光度を表し亜硝酸ソーダ各濃度における経時的なメトヘモグロビンの生成を比較検討した。両種マウスの比較では、亜硝酸ソーダ添加量 0.99~2.60 mM のいずれにおいてもアカタラセミアの方が、正常マウスより、メトヘモグロビンを生成する速度

が速いことが認められた。

3. メトヘモグロビン生成曲線の解析

両種マウスの溶血液は、ともに時間に対するメトヘモグロビン生成量では Sigmoidal curve を示す。この現象は、溶血液に亜硝酸ソーダを添加した後、除々にヘモグロビンよりメトヘモグロビンが生成され、一定の lag phase の後急速にメトヘモグロビンが生成され、次いで徐々に、反応が終わるためであると考えられる。筆者はメトヘモグロビン生成速度の解析に以下の二つのパラメーターを使用した。

① 誘導期；柿崎ら¹²⁾によって報告された亜硝酸ソーダで馬のオキシヘモグロビンよりメトヘモグロビン生成する際の、生成程度の算出法で、Sigmoidal curve の前半のメトヘモグロビンが急速に生成し始めるまでの時間を誘導期として、一つのパラメーターとした。

② 最高速度；誘導期後のメトヘモグロビンが一定の速度で急速に生成する時の速度をメトヘモグロビン生成期の最高速度とし次のパラメーターとしている。私は、これらを用いて正常及びアカタラセミアマウスの誘導期の時間による比較、またメトヘモグロビン生成期の最高速度による比較を行った。

4. メトヘモグロビン生成の誘導期をパラメーターとした比較

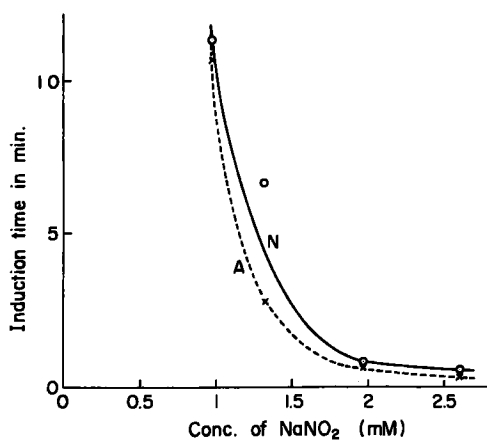


Fig. 2 Velocity of methemoglobin formation from hemoglobin in the hemolysates of normal (N) and acatalasemic (A) mice expressed as induction period.

図2では、図1A, B で得られた正常およびアカタラセミアマウスのメトヘモグロビン生成における誘導期の時間について比較した。横軸に亜硝酸ソーダの終濃度 (mM) をとり、縦軸に誘導期の時間 (分) をとり、それぞれの値をプロットした。この図よりわかる様に、正常およびアカタラセミアマウスともに、亜硝酸ソーダの濃度の増加に従って誘導期間は短縮した。亜硝酸ソーダの同一濃度で比較した場合は、いずれの濃度においてもアカタラセミアマウスの方が正常マウスより、誘導期が短く、したがってメトヘモグロビン生成速度の速いことが認められた。

図3では、横軸は図2で用いた亜硝酸ソーダの濃度の逆数を、縦軸は図2と同様に誘導期の時間を分単位で表示した。この時、添加した亜硝酸ソーダの終濃度0.99~2.60 mM の間で、正常およびアカタラセミアマウス溶血液はともに、亜硝酸ソーダの濃度の逆数と誘導時間との間に、ほぼ直線関係が認められた。

5. 最高速度をパラメーターとしたメトヘモグロビン生成の比較

図4の横軸は、亜硝酸ソーダの終濃度 (mM) を、縦軸には、1分間の630 nm における吸光度の増加によるメトヘモグロビン生成期の速度を表した。正常マウス、アカタラセミアマウスと

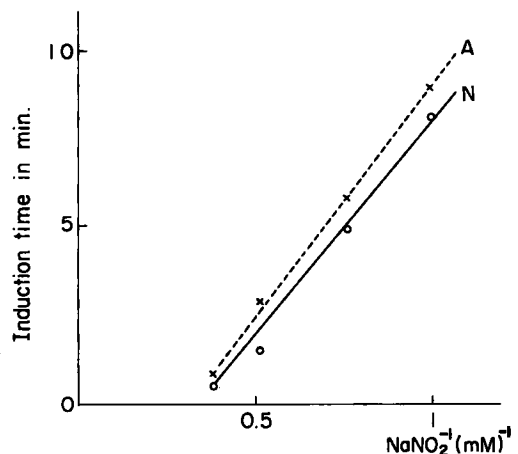


Fig. 3 Velocity of methemoglobin formation from hemoglobin in the hemolysates of normal (N) and acatalasemic (A) mice expressed as the reciprocal number of final concentration of NaNO₂.

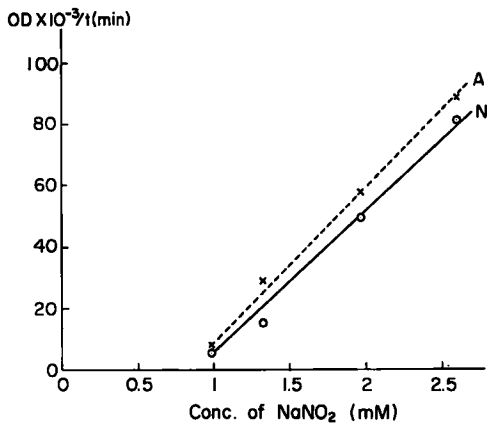


Fig. 4 Maximal velocity of methemoglobin formation from hemolysate of normal (N) and acatalasemic (A) mice.

もメトヘモグロビン生成速度は亜硝酸ソーダの濃度が増加するにしたがって直線的に増加することが認められた。

そして、亜硝酸ソーダの同一濃度におけるメ

トヘモグロビン生成の最高速度は、アカタラセミアマウスの方が速く、かつ亜硝酸ソーダの濃度が高いほど、その速度の差が大きくなることが認められた。

考 察

自動車等の移動発生源の増加に伴い、都市における大気汚染問題が深刻となり、特に窒素酸化物の有毒性が問題となってきている。中島ら¹³⁾は、マウスのNO₂ガス暴露実験において呼吸器系に強い悪影響を与えることを報告している。また血液の変化として、McCord⁵⁾は、溶接夫にメトヘモグロビン血症がみられたことやウサギ、ラットのNO₂ガス暴露でメトヘモグロビン血症がみられたことなどを報告している。NO_xはSO_xなどに比べると水に溶けにくいことからSO_xに比べ容易に肺の深部まで到達する¹⁴⁾。気道および肺を通して血液中に入るとNO₂は亜硝酸および硝酸となる。また、谷口ら⁸⁾の報告による亜

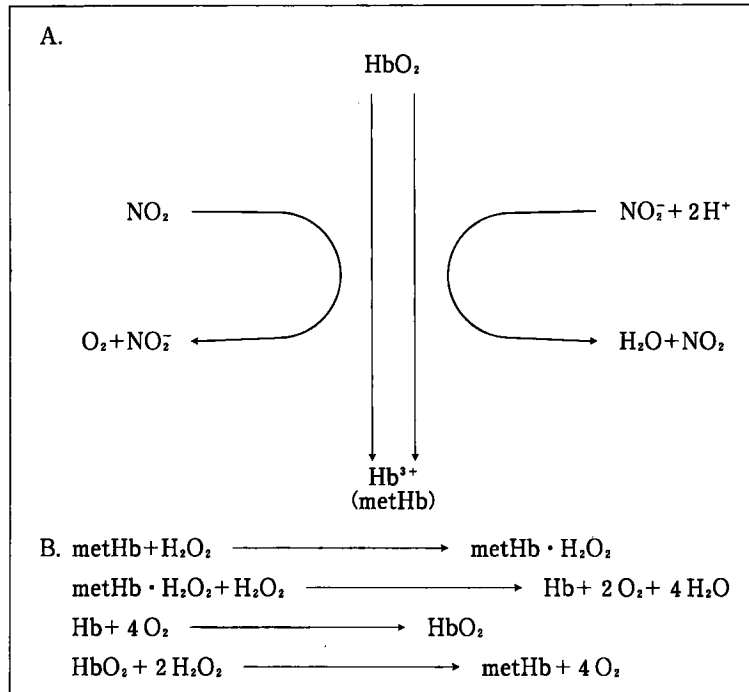


Fig. 5 Effect of hydrogen peroxide on methemoglobin formation by nitrite. (A) generation of hydrogen peroxide in the case of methemoglobin formation. (B) autoxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide -(hemoglobin-methemoglobin cycle)¹⁵⁾.

硝酸の経口摂取の可能性も考えられる。

亜硝酸によるメトヘモグロビン生成については、前述したが、これを化学反応の上から考察すれば以下のごとくである。すなわちオキシヘモグロビンを亜硝酸が酸化しメトヘモグロビンを生成する時、 H_2O_2 の発生を伴うと言われている(図5A)。この微量の H_2O_2 によってメトヘモグロビン化が、更に進むか否かについては現在では、Keilinc¹⁵⁾の述べる如く、メトヘモグロビンは自酸化的に増殖すると言われている(図5B)。又、亜硝酸によるメトヘモグロビン生成に対するカタラーゼの抑制作用は次のごとくである。第1には H_2O_2 を H_2O と O_2 とに分解しメトヘモグロビンが H_2O_2 により自酸化的に増殖するのを抑制する。第2にはカタラーゼと微量の H_2O_2 がコンプレックスを作りこのカタラーゼ・ H_2O_2 がペルオキシダーゼ作用により亜硝酸を硝酸に酸化し、 H_2O_2 を H_2O と O_2 に分解すること^{16,17)}により亜硝酸によるヘモグロビンよりメトヘモグロビンの生成を抑制すると考えられるが、これらの点については今後検討していくつもりである。

今回の実験は、正常マウスとアカタラセミアマウスの溶血液に亜硝酸ソーダを添加し、それぞれメトヘモグロビンを生成させた際にその生成速度に差を認めた。この事実は、正常マウスとアカタラセミアマウス溶血液に含まれるカタラーゼ量の差によるものであると考えられる。亜硝酸により生成されるメトヘモグロビンに対するカタラーゼの関係について、中馬⁷⁾らは、カタラーゼを添加することにより、メトヘモグロビンの生成を抑制する報告をしているが、私は正常及びアカタラセミアマウスの溶血液を用いて明らかにカタラーゼがメトヘモグロビン生成に抑制的に働いていることを認めた。すなわちアカタラセミアマウスは、 NO_x に対する高感受性集団の動物と考えられる。このことは、アカタラセミア溶血液の自酸化が正常より速い

とする小林²⁰⁾の研究からも推定できる。そして、日本人のアカタラセミアについても同様の結果が期待できる。

柿崎らの馬のオキシヘモグロビンを亜硝酸ソーダにより酸化する実験の報告では、メトヘモグロビン生成量と反応時間の関係が、誘導期を持つ反応であり、誘導期の時間と亜硝酸ソーダの濃度の二乗が、逆比例すること、メトヘモグロビン生成期の速度と亜硝酸ソーダの濃度が正比例することを述べている。

今回のマウス溶血液を用いた実験では、同様に誘導期を持つ反応ではあるが、前者については、誘導期の時間と亜硝酸ソーダの濃度の逆数が直線関係を示し、亜硝酸ソーダの濃度とメトヘモグロビン生成期の速度は、柿崎らと同様に、直線関係を示していることが認められた。

結 論

正常及びアカタラセミアマウス溶血液に亜硝酸イオンを加え、溶血液中のヘモグロビンよりメトヘモグロビンを生成させ、その際の速度を測定し以下の成績を得た。

- 1) 両種の溶血液はともに、亜硝酸ソーダの終濃度、0.99~2.60 mM 添加時においてヘモグロビンよりメトヘモグロビンの生成が認められた。
- 2) メトヘモグロビン生成を、その誘導期と最高速度をパラメーターとして比較した場合、亜硝酸ソーダの濃度のいずれの濃度においてもアカタラセミアマウスは、正常マウスよりもメトヘモグロビン生成の誘導期が短く、かつアカタラセミア溶血液中のメトヘモグロビン生成速度は、正常マウスのそれよりも高いことが認められた。

稿を終えるにあたり、耐えず御指導、御校閲いただいた岡山大学医学部公衆衛生学教室緒方正名教授に深謝致します。

文 献

1. Shy CM: The Chattanooga School Children Study; Effects of community exposure to nitrogen dioxide I methods description of pollutant exposure, and results of ventilatory function testing.

- J Air Pollut Control Assoc (1970)20, 539-545.
2. Shy CM: The Chattanooga School Children Study; Effects of exposure to Nitrogen dioxide II, Incidence of acute respiratory illness. J Air Pollut Control Assoc (1970) 20, 582-588.
 3. 志賀 健: 一酸化窒素の赤血球障害機構; 環境科学研究報告集, 文部省「環境科学」特別研究B-216-21-3 (1984) pp 1-10.
 4. Mccord CP: A chemical and physiological investigation of electric arcwelding III, Coated welding rods, J 1nd Hyg Toxicol (1941) 23, 200-215.
 5. 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, 講談社サイエンティフィック, 東京 (1979) pp 225-236.
 6. 上代皓三: 無カタラーゼ症; 血色素の生理と臨床, 上代皓三, 中尾喜久監修, 医学書院, 東京 (1958) pp 568.
 7. 中馬一郎, 小坂博昭: 亜硝酸塩によるオキシヘモグロビンのメトヘモグロビンへの酸化反応; 環境科学研究報告集, 文部省「環境科学」特別研究B-216-21-3 (1984) pp 11-22.
 8. 谷口茂彦, 河田安史: 人体における硝酸塩の移行, および代謝生合成の口腔内生態系の関与, 岡山歯医 (1986) 5, 1-11.
 9. 河田安史, 谷口茂彦: 硝酸塩の移行と代謝—とくに口腔内生態系を含めた人体における最近の諸問題—, 広島歯誌 (1978) 10, 1-20.
 10. Feinstein RN: Perborate as substrate in a new assay of catalase. J Biol Chem (1947) 180, 1197-1202.
 11. Van Assendelft OW: Spectrophotometry of Haemoglobin Derivatives. Royal Vangorcum Ltd. Assen Netherland (1970).
 12. 柿崎敏雄, 佐藤光男, 鶴田 寛, 長谷川弘道: 亜硝酸ソーダによるオキシヘモグロビンの酸化について, 生化学 (1964) 37, 14-20.
 13. 中島泰知, 楠本繁子, 陳 震東, 岡本一也, 服部正次, 建石竜平, 吉田 亮, 佐藤耕三, 井手源四郎, 大津裕司, 原 義守: 窒素酸化物の生体におよぼす影響 (NO₂の動物暴露実験); 光化学反応による大気汚染 (1972) pp 145-156.
 14. 外山敏夫: 総説, 光化学反応による大気汚染成分の生体影響の医学的考察: 光化学反応による大気汚染 (1972) pp 111-122.
 15. Keilin D and Hartee EF: Reaction of methemoglobin and catalase with peroxides and hydrogen donors. Nature (1954) 173, 720.
 16. Heppel LA and Porterfield VT: Metabolism of inorganic nitrite and nitrate esters. J Biol Chem (1949) 178, 549-556.
 17. Keilin D and Hartee EF: Properties of catalase. Catalysis of coupled oxidation of alcohols. Biochem J (1945) 39, 293.
 18. 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, 岡山医学会雑誌 (1987) 99, 389-400.

**Methemoglobin formation by nitrite ion in the hemolysates
of normal and acatalasemic mice**

Naoya IOKU

Department of Public Health, Okayama University, Medical School,

2-5-1 Shikata-cho, Okayama, Japan

(Director: prof. M. Ogata)

The formation of methemoglobin from hemoglobin in the hemolysates of normal and acatalasemic mice was studied by addition of nitrite ion in the range from 0.99-2.60 mM. Data indicated that induction period of methemoglobin formation in the acatalasemic hemolysate is shorter than that in the normal hemolysate and maximal velocity in the acatalasemic hemolysate is heigher than that in the normal hemolysate. The results indicated that velocity of methemoglobin formation in the acatalasemic hemolysate is faster than that in the normal hemolysate.