メトヘモグロビンの還元機序に関する研究

Studies on the Reduction of Methemoglobin

東京慈恵会医科大学公衆衛生学教室

山村 行 夫

Yukio Yamamura

Department of Public Health, Tokyo-Jikeikai School of Medicine

緒 言

芳香族ニトロ、アミド化合物を用いる染料、化学薬品、爆薬工場などにみられる職業性中毒としてのメトヘモグロビン血症はかなり古くから注意されてきた。本症はフェナセチン、スルファミン、次硝酸蒼鉛、硝酸アンモニウムなどの薬物を投与した際、あるいは不良な染色毛布、スタンプリンク¹⁾、ランドリーマークに接触した際にもみられる。硝酸塩を多く含む食物または薬物の摂取は腸内細菌叢の作用で亜硝酸塩を形成し本症を生ずる。症例報告として述べられているなかには硝酸塩を多量に含む飲用水を常用した乳児が本症を呈した例が認められた²⁾。さてメトヘモグロビン(以下 MetHb と略す)とはヘモグロビン(以下 Hb と略す)の配合簇中の Fe^{++} 原子が酸化されて Fe^{+++} 原子に変えられたものである。Hb の酸素化あるいは CO との結合には鉄原子が Fe^{++} であることが必要であり、したがって MetHb の形では酸素の運搬力はなく、不活性 Hb と呼ばれている。上記のような原因が加わり Hb に対する MetHb の割合が増加すると当然組織への酸素供給は障害され組織は酸素欠乏の状態となる。久保田³⁾ は MetHb による酸素欠乏症状の出現について全 Hb 量の 20% までは無害であり、40% で酸素欠乏症状が出現し、60~75% では生命に危険であると論じている。本症の治療に関する研究は主に先天性 MetHb 血症を対象として進められており、本症に対するアスコルビン酸の有効性は Lian et al.^{4,5)} に始まる多くの研究がある。Hauschild⁶⁾ が酸化還元色素であるメチレン青が MetHb 形成を伴う中毒症状を軽減することを指摘してから、Wendel⁷⁾、Bodansky et al.⁸⁾ によりメチレン青の有効性は広く推奨されている。これらの報告者はメチレン青が単独に Hb に加えられるとき、MetHb 部分の還元は著しく促進されるという。最近

Mangelsdorff⁹⁾ は MetHb 血症の場合の治療を総括しているが、彼はメチレン青で治療した例に心電図所見に異常を認めたことを報告し、MetHb 形成が軽度であれば糖液を飲用せしめ、医師の注視下で十分な安静をとらせることが治療の根本であると結論し、メチレン青の使用は細心の注意が払われるべきであると述べている。MetHb 消失の割合は種族差、個体差がきわめて大きく、実験動物の結果をそのまま臨床例に応用することは危険である。MetHb の還元機序に関しては既に Kiese¹⁰⁻¹²⁾、Gibson¹³⁾、Gutmann et al.¹⁴⁾ の詳細な研究があるがまだ充分解明されてはいない。著者は草食動物としてはウサギ赤血球を、雑食動物としてはヒト、イヌ赤血球を用い MetHb の還元機序を検討した結果特に赤血球の解糖作用との間に興味ある知見を得たので報告する。

測定方法

I. 血中 MetHb の定量

a) 原 理

2 種以上の成分よりなる溶液の吸光係数は、各成分に干渉作用がないとすれば、その各々の吸光係数の和に等しい。

$$E_t = E_1 + E_2 \dots \dots \dots (1)$$

単位濃度、単位厚さの溶液を一定波長で測定した吸光係数を 特異的吸光係数として自己の比色計で測定しておく。濃度と被検溶液の吸光係数との間には次の関係がなりたつ。

$$X = E/\epsilon_x \dots \dots \dots (2)$$

X は濃度、E はその溶液の吸光係数、 ϵ_x は成分 x の特異的吸光係数である。

被検溶液が 2 種成分からなる場合に各成分の濃度は 2 波長における各成分の特異的吸光係数がわかると Vie-rordt¹⁵⁾ の連立方程式を用い算出することができる。

$$E_{am} = \epsilon_{ax} X + \epsilon_{ay} Y \dots \dots \dots (3)$$

$$E_{bm} = \epsilon_{bx} X + \epsilon_{by} Y \dots \dots \dots (4)$$

(3) と (4) から

$$X = \frac{\epsilon_{by} \cdot E_{am} - E_{bm} \cdot \epsilon_{ay}}{\epsilon_{by} \cdot \epsilon_{ax} - \epsilon_{ay} \cdot \epsilon_{bx}} \dots \dots \dots (5)$$

$$Y = \frac{\epsilon_{ax} \cdot E_{bm} - E_{am} \cdot \epsilon_{bx}}{\epsilon_{by} \cdot \epsilon_{ax} - \epsilon_{ay} \cdot \epsilon_{bx}} \dots \dots \dots (6)$$

E_{am} …… 波長 a での被検溶液の吸光係数

E_{bm} …… 波長 b での被検溶液の吸光係数

ϵ_{ax} …… 波長 a での成分 x の特異的吸光係数

ϵ_{ay} …… 波長 a での成分 y の特異的吸光係数

ϵ_{bx} …… 波長 b での成分 x の特異的吸光係数

ϵ_{by} …… 波長 b での成分 y の特異的吸光係数

X, Y は成分 x, y の未知濃度を示す

被検液が 2 種の有色物質の混合液であり、そのうちいずれか一方の物質の濃度が知りたい。この際混在物質の濃度に変化を与えずに被検物質の吸光係数のみ変える方法があれば操作は一層簡単になる。すなわち次の式が成立する。

(3), (4) 式にならい、

$$E_{am} = \epsilon_{ax} X + \epsilon_{ay} Y \dots \dots \dots (7)$$

$$E_{am}' = \epsilon_{ax'} X + \epsilon_{ay} Y \dots \dots \dots (8)$$

(7), (8) 式より、

$$X = \frac{E_{am} - E_{am}'}{\epsilon_{ax} - \epsilon_{ax'}} \dots \dots \dots (9)$$

E_{am} …… 波長 a での被検溶液の吸光係数

E_{am}' …… 波長 a での上記溶液について被検成分 x を x' に変えた場合の吸光係数

ϵ_{ax} …… 波長 a での成分 x の特異的吸光係数

ϵ_{ay} …… 波長 a での混在成分 y の特異的吸光係数

$\epsilon_{ax'}$ …… 波長 a で成分 x を x' に変えた場合の特異的吸光係数

X, Y はそれぞれ成分 x, y の濃度を示す。

ただしこの場合成分 x の濃度が色調を変えられた前後で変化しないこと、ならびにこの成分 x に対する操作が混在成分 y に影響しないことが必要である。以上の操作は Michel¹⁶⁾ が Hb-O₂ と MetHb 混合液の MetHb の測定に用いた方法であるが、この方法は $(E_{am} - E_{am}')$ の差が大きい波長を選べば単一波長領域の測定のみで被検成分の濃度が測定できてきわめて便利である。MetHb は pH 7 以下で 630, 500, 405~407 $m\mu$ に吸収極大を有する。MetHb 溶液にごく少量の結晶 KCN を添加すると、鉄原子と CN⁻ は定量的に結合し MetHb 濃度に変化を与えずに 630 $m\mu$ の山が消失し MetHb-CN の滑らかな曲線になる。この際 Hb と CN⁻ の結合は

ごく緩慢であり 50°C で 30 分を要するといわれる¹⁷⁾。すなわち著者の測定ではあまり障害とはならなかった。

b) 基本的操作

容量 12 ml 遠沈管に M/60 磷酸緩衝液 (pH 6.6) 10 ml をとり、ヘパリン加血液の 0.1 ml を加える。さらにサポニン小刃尖量を加えて充分溶血を助け、3,000 r.p.m., 10 分間で血球破質を沈澱除去する。その上清を直ちに Beckmann 型日立光電比色計を使用し、波長 630 $m\mu$, スリット幅 0.06 を用いて測定をおこなう。使用したキューベットは 1.0 cm 幅のものである。Blank としては蒸留水を用いた。

c) 定量式の作成

16 g/dl 濃度 MetHb の基準液を用い、この 0.1 ml を上記緩衝液の 10 ml に稀釈する。この溶液について、波長 630 $m\mu$ で上記のごとく吸光度 ϵ_{ax} を求める。ついで同じキューベットに結晶 KCN (Merk 製) の小刃尖量を添加すると MetHb の赤褐色は MetHb-CN の鮮紅色に変る。そこで 5 分間静置後再び 630 $m\mu$ で吸光度を測定し $\epsilon_{ax'}$ を求める。その値を (9) に代入すると、

$$X = \frac{E_{am} - E_{am}'}{0.44 - 0.054} = \frac{E_{am} - E_{am}'}{0.386} \dots \dots (10)$$

となる。

資料中 MetHb 濃度を測定するには (10) 式で得た値に 16 g を乗ると MetHb gm/血液 100 ml として算出することができる。実際の測定に際して注意すべきこと

Fig. 1 Spectrophotometric Curves of MetHb & MetHb-CN

は、一度使用したキューベットは次の使用の前には充分に洗滌することである。もしキューベット中に KCN が残っていると、次に MetHb 被検溶液を入れた際に MetHb-CN を形成し、思わぬ誤差を生ずることがある。

II. ブドー糖の定量法

Somogyi-Nelson 法¹⁸⁾ によつた。

III. 乳酸の定量法

Baker & Summerson 法¹⁹⁾ によつた。

IV. 焦性ブドー酸の定量法

Friedmann & Haugen 法²⁰⁾ によつた。

V. アスכולビン酸の定量法

藤田-老名原法²¹⁾ によつた。

VI. 2, 3 の試薬について

リンゲル液の処方方は NaCl 0.9%, KCl 0.4%, CaCl₂ 0.011%, Na₂HPO₄ 0.177%, pH 7.4 ならびに NaCl 0.9%, KCl 0.02%, CaCl₂ 0.02%, phosphate (Na₂HPO₄, NaH₂PO₄) 0.1M, pH 7.4 を用いたがいずれの場合も差はなかつた。

Tyroid 氏処方方は NaCl 0.8%, KCl 0.02%, CaCl₂ 0.02%, MgCl₂ 0.01%, NaH₂PO₄ 0.005%, NaHCO₃ 0.1% である。

ATP ソーダは興和化学製, DPN は第一化学製を用いた。

実験方法ならびに結果

I. ウサギ赤血球内の MetHb 還元速度について

赤血球浮遊液に亜硝酸塩を加えると Hb は酸化されて MetHb になる。こうしてできた MetHb も環境液が適

当であれば、次第に還元され、還元型 Hb となり活性をとり戻すのである。このような還元作用が環境液の還元物質によるものであるか、または赤血球内に含まれる還元物質の機能に基づくものであるかを知るためまず次のごとく実験を試みた(第2図)。

2.5 kg 雄ウサギの静脈血をヘパリン処理のもとに採血し、遠心沈澱で血球層と血漿層に分ける。容量 30 ml の三角コルベンを用い、一方には赤血球 1 ml, 血漿 1 ml, およびリンゲル液 2 ml を混合する。他方のコルベンには赤血球 1 ml, リンゲル液 3 ml を混合する。次に両コルベンを 37°C 恒温槽中で軽く振盪し、フラスコ内外の温度を平衡させ、そこで 1% NaNO₂ 0.1 ml を加えゴム栓を施して incubate を続ける。実験は好気的条件下で 5 時間にわたって施行し、資料は 1 時間ごとに採取し、上記の方法で MetHb 濃度を測定した。実線は環境液に血漿を加えた場合であり、5 時間後には MetHb のほとんどが消失している。点線は環境液がリンゲル液のみの場合であり、この際には incubate の初期に MetHb が還元され一時減少するのであるが、その後は MetHb の含有量がどんどん増加して行くことが観察される。この実験の結果は、intact 赤血球内で MetHb が還元されるには環境液に血漿が必要であることを示唆するものである。血漿環境で MetHb の還元が速やかであるということは、血漿中に含まれるいかなる物質の作用によるものであるのか、血漿中に含まれる還元物質としては、アスכולビン酸、ブドー糖、果糖あるいはその大部分は酸化型であるが、グルタチオンなどが挙げられる。アスכולビン酸は紫外線により酸化されることが知られている。第3図はあらかじめ紫外線を照射した血漿と未照射の正常血漿を用いた場合について、赤血球の MetHb 還元速度に差があるかどうかを比較検討したものである。

特に照射血漿については紫外線照射ののち血漿のアスכולビン酸含有量を藤田-老名原法²¹⁾で測定し、還元型アスכולビン酸をまったく含まないことを確かめてから実験に用いた。以下 MetHb 血球という場合は、動物よりヘパリン処理のもとに採血し、のち血漿を除去して赤血球のみを 1% NaNO₂ リンゲル液中に浮遊し、この液を 37°C の恒温槽中で 10~20 分間 incubate し、次にリンゲル液で 3~5 回洗滌して NaNO₂ を除去し調製した赤血球についての名称である。実線は血液 2 ml 相当 MetHb 血球に正常血漿を加え全量 4 ml としたものであり、点線は血液 2 ml 相当 MetHb 血球に紫外線照射血漿を加え全量を 4 ml としたものである。この結果環境液に照射血漿を用いた場合の MetHb 還元速度が対照の未照射

Fig. 2 MetHb Reduction (Rabbit)

Fig. 3 Effect of Irradiated Plasma on MetHb Reduction (Rabbit)

Fig. 4 Effect of Various Substrates on MetHb Reduction (Rabbit)

血漿を用いた場合よりも遅れるということとはなかつた。赤血球は他の組織よりもグルタチオンを多量に含有しており²²⁾、デハイドロアスコルビン酸はグルタチオンにより還元されアスコルビン酸に戻る²³⁾。一方酸化型グルタチオンはブドー糖を基質として、グルタチオン還元酵素の作用で再還元されるのである²⁴⁾。2, 3の研究者は循環赤血球中に生じた MetHb を生理的に還元するものは、赤血球中に含まれるアスコルビン酸-グルタチオン系であると考えている^{25, 26)}。第3図に示されたような結果ももし酸化されたアスコルビン酸でも incubate 中に赤血球中に滲透し、そこで大量に含まれるグルタチオンで賦活されると考えるならばアスコルビン酸の作用であると考えることができる。そこでこのような推論のもとに、リンゲル液に 10 mg/dl アスコルビン酸ならびにグルタチオン還元基質としてブドー糖の 100 mg/dl を加え、これを前回同様に紫外線を照射し、アスコルビン酸を酸化してのち MetHb 血球の環境液として用い還元速度を測定した。この結果は対照のブドー糖リンゲル液との間に差はなく、したがって以上の推論は否定された。d-ブドー糖、d-果糖、d-マンノース、d-ガラクトース、あるいは乳酸を含むリンゲル液を用いると MetHb が還元されることは Kiese¹¹⁾、Wendel²⁶⁾、Spicer²⁷⁾ により報告されている。次の実験はこの点を追試し、ブドー糖、乳酸、果糖 1.6 チリン酸ならびに焦性ブドー酸を基質とした場合の MetHb 還元速度を比較検討した。

第4図は血液 2 ml 相当赤血球を基質の各々 100mg/dl を含むリンゲル液中に浮遊し全量を 4 ml としたものに最初の実験と同様に 1% NaNO₂ の 0.1 ml を添加し各時間ごとの MetHb 濃度を測定したものである。ブドー糖、乳酸が基質である場合には Hb の酸化は防がれ、緩慢ではあるが MetHb は還元されることがわかる。基質が果糖 1.6 チリン酸および焦性ブドー酸であると還元はみられない。糖の中間代謝産物である環境液中のリン酸エステルが赤血球で代謝されないということから、赤血球膜はこのようなリン酸エステルは透過しないと考えられている²⁸⁾。この実験で、果糖 1.6 チリン酸では還元のみ見られない事実はやはりこのリン酸エステルが赤血球内に入ることができないためと考える。さてブドー糖あるいは乳酸が環境液中に含まれていると浮遊赤血球内の MetHb は緩慢ではあるが還元されることがわかった。ウサギ血漿中にはブドー糖は約 100 mg/dl、乳酸は 20 mg/dl 前後含まれている。環境液が 200 mg/dl ブドー糖リンゲル液を用いた場合と血漿である場合の MetHb 還元速度を第

Table 1

No.	medium	
	plasma	glucose Ringer
1	5.32 g %/3 hr	0.98 g %/3 hr
2	8.92 "	1.46 "
3	7.23 "	2.62 "
4	11.08 "	3.70 "

1表に示す。これは3時間に還元された MetHb の g % である。

ここで明らかにようにウサギでは、*in vitro* の観察で環境液が血漿である際にのみ赤血球の MetHb をほぼ完全に還元することができるのである。

次に血漿中に含まれるブドー糖、乳酸の MetHb 還元物質としての役割について検討した結果を述べる。

a) 解糖作用の中間においてグリセリンアルデヒド 3 磷酸が酸化されるときは赤血球内の焦性ブドー酸は還元され乳酸を生成する。この間の酸化還元には助酵素 DPN⁺ が関与している。その間の大略は次のとおりである。

モノヨード酢酸は三炭糖磷酸脱水素酵素を強く阻害する。血漿に 2×10^{-3} M モノヨード酢酸を添加した場合の MetHb 還元は3時間後約55%阻害された。Gibson¹³⁾ はブドー糖リンゲル環境液中でのヒト赤血球内の MetHb 還元は 2×10^{-3} M モノヨード酢酸の添加で90%阻害されることを、さらにまた Spicer²⁷⁾ は 10^{-5} M モノヨード酢酸で70%抑制されることを報告している。血漿にモノヨード酢酸を加えると MetHb の還元が約55%抑制されることは、この還元機序に三炭糖磷酸脱水素酵素の関与が重要であることを物語るとともに、抑制を受けない部分のあることは乳酸酸化が関連するなどこれ以外の過程が存在することも考慮される。

Fig. 5 Effect of Plasma on MetHb Reduction (I) (Rabbit)

b) ブドー糖、果糖、マンノースなどの六炭糖はパン酵母で醗酵分解を受ける^{28,29)}。血漿にパン酵母を加え、37°Cの恒温槽中で30分間 incubate し、その後、遠心沈澱により酵母を除去した血漿を環境液として用いた場合の MetHb 還元速度について測定した。この血漿は実験にさきだち Somogyi-Nelson 法で還元性糖を含有しないことを確かめてから用いた。この結果では3時間後の MetHb の還元量は78%の阻害を受けた。

c) Brooks³¹⁾はウサギに亜硝酸塩を投与し MetHb を形成させた場合、引続いて1%ブドー糖液を2ml 静脈注射すると対照に比較し MetHb の消失が早まることを報告しており、また Cox & Wendel³²⁾ はイヌ赤血球について *in vivo* および *in vitro* の実験で血糖が40~400 mg/dl の範囲では MetHb 還元速度への影響はみられないと述べている。著者は添加後ブドー糖濃度が396 mg/dl を示した血漿を環境液として用いその還元速度を観察した。第6図に示すごとく、未添加血漿の場合との間に差は認められない。したがって、この所見から血漿

Fig. 6 Effect of Plasma on MetHb Reduction (II) (Rabbit)

中のブドー糖含有量がごく低濃度である場合を除いては、環境液中のブドー糖濃度を増加させる操作のみで解糖速度を促進し、その結果 MetHb 還元を早めるというような簡単な機序を考えることはできない。

d) MetHb 血球の量を減らして赤血球に対する血漿

の割合を増せば還元速度はやや促進された。ブドー糖分解の過程に基づく MetHb の還元能は赤血球内に含まれる酵素系の機能により制限される。環境が血漿であることが、これら還元系にとりもつともよい代謝回転の条件を提供するものと考ええる。

e) 弗化物は Mg^{++} と強く結合し Magnesium fluorophosphate を形成する。したがって Mg^{++} を必要とするエノラーゼ活性が弗化物の添加で阻害され、焦性ブドー酸生成は減少し 隣グリセリン酸が増加してくる³³⁾。Gibson¹³⁾の成績ではブドー糖リンゲル液を環境液に用いた場合、0.01 M 弗化ソーダを添加しても MetHb の還元は阻害を受けないというが、これに反し Shapot³⁴⁾は弗化ソーダの阻害作用を認めている。また Drabkin³⁵⁾は弗化ソーダの阻害は焦性ブドー酸を添加しておくで防がれると報告している。著者は環境液として弗化アンモニウムを添加した血漿を用い、未添加血漿の場合と比較して MetHb 還元能が約20%阻害される結果を得た。

II. ウサギ溶血液中 MetHb の還元について

ブドー糖分解の中間代謝物質は大部分が隣酸エステルである。これらの化合物は前述のように赤血球膜を透過できない。そこで解糖作用のどの過程と関連して MetHb が還元されるのかを確かめるには溶血系での実験を試みねばならない。

Fig. 7 Effect of Concentration of DPN on MetHb Reduction (Hemolysate)

第7図、左側に示す実験では血漿、200 mg/dl ブドー糖リンゲル、リンゲル、200 mg/dl 果糖 1.6チ隣酸リンゲルのそれぞれの環境液中で MetHb 血球にサボンを加えて溶血し 礎質を可及的に除いた各々についての MetHb

還元能を示す。いずれの場合にも還元を認めることができなかった。第7図、右側の実験は MetHb 還元における DPN⁺ の役割を検討するために試みたものである。基質として 200 mg/dl 果糖 1.6チ隣酸を含む $1/15$ M 隣酸緩衝液に DPN ソーダを倍数稀釈で加え、この環境中で MetHb 血球を溶血せしめ、その溶血系 MetHb の還元能に及ぼす DPN⁺ 濃度の影響を検討した。図に示されるようにいずれも明らかな還元は認められず、したがって DPN⁺ 濃度との関係を追求することができなかった。従来、赤血球のブドー糖消費は溶血すると消失することが報告されている³⁶⁾、Gibson¹³⁾は溶血液中では MetHb の還元が起きないと述べている。さてこのように溶血に伴ない還元能が失われる理由としては次のように考えている。赤血球膜には ATP-ase、DPN-ase が含まれている。赤血球が溶血されるとこれらの酵素は赤血球内の隣酸代謝および脱水素反応に必要な ATP、DPN を分解してしまうのである。その結果は、解糖作用は止まりこれと関連する MetHb 還元能も失われる。Gutmann et al.¹⁴⁾は DPN をハイドロサルファイトをもつて還元 DPN とし、この製剤を MetHb 溶液に加えれば還元作用が現われることあるいは溶血にさきだちあらかじめニコチンアミドを加えておけば DPN-ase 作用が抑制されるので MetHb 還元がみられると述べ、DPNH の関与を強調している。著者の実験で還元作用がみられなかった理由としては次の2つを考えている。すなわち、基質である果糖 1.6チ隣酸が解裂し脱水素と酸化的隣酸化により隣グリセリン酸を生ずるまでに必要な酵素系が障害されること、または解糖作用で生じた還元物質 (DPNH) が MetHb の還元を利用される間に位置する酵素系に障害が現われるということである。

III. ウサギ赤血球の MetHb 還元時、ブドー糖、隣酸、焦性ブドー酸の消長について (第8図)

a) ブドー糖

実験材料は上記 MetHb 還元速度の測定に用いたと同じフラスコ内血液から得たものである。MetHb 血球および対照正常赤血球による環境ブドー糖の消費量を図示する。MetHb 血球の浮遊している環境液中のブドー糖減少量は反応5時間でブドー糖リンゲル環境では31 mg/dl であり、血漿環境では48 mg/dl である。血漿環境での減少は速やかである。

b) 隣酸

哺乳動物の成熟赤血球は チトクロームあるいは TCA 回路系の酵素を保有せず、したがって生活エネルギーの供給は もつぱら 解糖作用に求めている。隣酸は 解糖作

Fig. 8 Comparison of Glycolysis and MetHb Reduction (Rabbit)

用の終末産物であり、分解がきわめて緩慢であるために解糖が進行するに伴ない血漿中に増加してくる。通常血漿中乳酸の含有量は 10~20 mg/dl である。正常赤血球を用いると乳酸は時間の経過に伴ない環境液中に増加する。MetHb 血球の場合では初期に一時増加するが、しかし環境がブドー糖リンゲル液であるところの増加した乳酸も 5 時間後には消失する。血漿環境では実験前値と 5 時間値の差は僅少である。このことはその生成と基質としての利用が競り合っているためである。モノヨード酢酸添加血漿では増加はやや抑えられ、弗化アンモニウム添加血漿では乳酸の焦性ブドー酸からの生成がないために血漿中に既存の乳酸が 3 時間後には完全に利用されつくし消失する。

c) 焦性ブドー酸

正常赤血球の代謝過程では焦性ブドー酸は還元され速やかに乳酸を生成する。したがって、血漿中に遊離する焦性ブドー酸の量はきわめてわずかであり、もしも赤血球内に MetHb が多量に含まれていると血漿中の焦性ブドー酸は増加してくる。この測定に際しての資料採取法は

すべて前記同様の条件下でおこなった。浮遊血球が正常赤血球ならば 5 時間後でもほとんど増加はみられない。これに反し、MetHb 血球が血漿環境に浮遊されている場合は焦性ブドー酸の著しい増加を招いた。弗化アンモニウムあるいはモノヨード酢酸を添加した血漿ではその増加はややわずかである。環境がブドー糖リンゲル液であれば焦性ブドー酸の増加はさらに少かつた。

IV. イヌ赤血球内の MetHb 還元速度について

体重 10 kg 雌性イヌの静脈血を採取し、遠心沈澱をもつて血球と血漿を分ける。血球層の表層にある白血球を充分に除き、ウサギでおこなったと同様に亜硝酸塩を加えて *in vitro* で MetHb をつくり、MetHb 血球として実験に用いた。アニリン中毒の MetHb 血球は同犬にアニリンの 5 cc を皮下注射し、*in vivo* で MetHb をつくり、2 時間に採血し、以下上記同様に操作して実験に用いた。フラスコ内容は赤血球が 4 倍稀釈となるように環境液をもつて稀釈したものである。用いた赤血球内 MetHb 含有量は緑色素量に対し、亜硝酸塩処理で 70%，アニリン中毒で 30% であった。アニリン中毒 MetHb についての還元速度は 5 時間で血漿環境で 2.2 mg、ブドー糖リンゲル環境で 1.1 mg であり、亜硝酸塩処理 MetHb の場合ブドー糖リンゲル環境で 0.4 mg といずれもウサギ赤血球と比較し、きわめて緩慢であることを知った(第 9 図)。

Fig. 9 MetHb Reduction (Dog)

MetHb Cells of Anilin Poisoning and Prepared by Nitrite

V. イヌ赤血球の MetHb 還元時, 乳酸, 焦性ブドウ酸の消長について

a) 乳酸

環境液中の乳酸は時間の経過に伴ないほぼ直線的に増加する。200 mg/dl ブドウ糖リンゲル液環境では正常赤血球と MetHb 血球間に乳酸生成量の差はみられない。血漿環境では MetHb 血球であるに拘らず乳酸生成はやや著しい。亜硝酸塩処理で MetHb が高濃度に形成される場合は乳酸の生成はいくぶん低値を示した(第10図)。

Fig. 10 Glycolysis of MetHb Cells (Dog)

MetHb Cells of Anilin Poisoning and
Prepared by Nitrite
Lactate

b) 焦性ブドウ酸

赤血球内に MetHb が多量に形成される場合にウサギ血液でみられた特徴ある所見は焦性ブドウ酸が増加することであつた。しかるにイヌの場合では正常赤血球と比較し MetHb 血球の焦性ブドウ酸の増加量は環境が 200 mg/dl ブドウ糖リンゲル液であつても, あるいは血漿を用いても, さらに MetHb 含有量が著しく違つていても, その増加量はほとんど同じ程度にみられるにすぎなかつた(第10図)。

VI. ヒト, イヌ, ウサギ赤血球内 MetHb 還元速度の比較

ヒト, イヌ, ウサギ赤血球について前述の実験とその後の2, 3の実験を総括し, 動物の種族差による還元能の差異ならびに環境液, 特に血漿環境の MetHb 還元に及

ぼす影響に関して考察した。比較に用いた実験はすべて亜硝酸塩でつくられた MetHb 血球についての成績であり, 還元速度を表わすためには実験前の MetHb 濃度に対し37°C恒温槽で3時間 incubate したのち, 還元された MetHb 量を百分率で示し, 還元率として記述した。実験対照はヒト健康青年男子3名, イヌ10 kg 雄1匹, ウサギ 2.5 kg~3 kg 雄8羽を用い, 図に示した値はそれぞれの平均である。ヒトならびにイヌ赤血球の MetHb 還元は環境がブドウ糖リンゲル液である場合と血漿である場合ではその差は少く, 還元傾向はいずれも僅少であつた。ウサギ赤血球にみられる所見はこれときわめて対照的であり, それが血漿環境であれば実に MetHb の90%が還元される。しかしブドウ糖リンゲル環境に浮遊された赤血球では, 還元率は約30%であるにすぎない, しかも完全に Hb に還元することはできなかった。この一連の実験中ウサギ赤血球でみられる血漿環境での特異性はきわめて印象的であつた(第11図)。

Fig. 11 Difference of Animal Species on
MetHb Reduction Rate (in vitro)
(reaction period 3 hr at 37°)

血漿環境とブドウ糖リンゲル環境間のこの差異の理由について検討した結果を示すと,

a) Mg^{++} は解糖系酵素中のヘキソキナーゼ, エノラーゼおよび DPN 生合成の co-factor として必要であることが知られている³⁷⁾。この金属イオンは通常のリンゲル液には含まれていない。そこで環境液に Tyrode 液を用いて同様に操作をし MetHb 還元能をブドウ糖リンゲル液と比較検討したが両環境間に差を見出すことはできなかった。

b) インシュリンが血糖をさげるのは直接または間接にヘキソキナーゼ活性に作用しブドウ糖の磷酸化を促進するのであると考えられている³⁸⁾。ブドウ糖リンゲル液

にインシュリンを 1 単位 /ml の割に加え、従来のブドー糖リンゲル液との差を比較したが、ここでも血漿効果と関連のないことを確めた。

c) 赤血球膜(礎質)には特異的コリンエステラーゼが含まれており³⁹⁾、赤血球の酸素消費に対する糖効果がアセチルコリンで抑制されるという観察がある⁴⁰⁾。そこで赤血球膜の基質透過性にアセチルコリンあるいはコリンエステラーゼがなんらかの形で関与するのではないかと考え、アセチルコリンおよびエゼリンを用いて MetHb の還元能を観察したが、ブドー糖リンゲル液との間には有意な差をみることはできなかった。すなわち現在まだ、血漿とブドー糖リンゲル液間のこの差を説明できるような証拠は得られていない。さらに 2, 3 重要な知見を追加すると、ウサギ赤血球の還元能はヒト血漿を加えてもかなり生ずることを教室の峯岸⁵¹⁾は酸素消費の面から示した。またウサギが連続瀉血で貧血におちいる場合、そのような赤血球を用いると、ヒトなどの赤血球と同様還元はごく緩慢となる。その原因については目下教室において引続き検討している。

VII. ヒト, イヌ, ウサギ赤血球の MetHb 還元時、 乳酸ならびに焦性ブドー酸の消長について

上記 MetHb 還元を用いたと同じ資料について、ヒト, イヌ, ウサギ赤血球の MetHb 還元時の乳酸ならびに焦性ブドー酸の消長について、ブドー糖リンゲル環境と血漿環境とに分けて比較検討する。白柱はブドー糖リンゲル環境を、黒柱は血漿環境をそれぞれ示す。反応時間 3 および 5 時間の測定値を平均し図示した(第12図)。

Fig. 12 Glycolysis of MetHb Cells

ヒト赤血球では乳酸は 3 時間 および 5 時間後に 約 10 mg/dl 前後の増量を示した。この量にはブドー糖リンゲル液環境と血漿環境との間に特に差を見出すことはできない。焦性ブドー酸の増量は 3 時間値, 5 時間値のいずれも微量であり、これまた環境差による生成量の差を見出すことはできない。次にイヌ赤血球を用いた場合の成績を示すとブドー糖リンゲル環境および血漿環境のいずれについても乳酸の生成はかなり旺盛であり、その増加は 3 時間値よりも 5 時間値が大きく、時間の経過と乳酸の増加はかなり直線関係を示している。これらの所見ではイヌ赤血球の乳酸生成がヒト赤血球のそれと比較して著しく高く、したがってイヌ赤血球の解糖作用がヒト赤血球のそれよりも旺盛であるかのような結果を示している。しかしこの点ではイヌのみは血漿環境での実験にアニリンおよびニトロベンゼン中毒 MetHb 血球に関する資料を用いており、この赤血球の MetHb 含量が前述のごとく低濃度であつたということを、この際考慮せねばならない。焦性ブドー酸の増加量はごく少く、したがって時間的変化あるいは両環境の影響について、特に差はみられなかった。これらの観察は正常赤血球の乳酸、焦性ブドー酸にみられる傾向とかなり類似していることが知られる。すなわちヒトあるいはイヌ MetHb 血球で解糖作用の特にこの間の変化は正常赤血球のそれとあまり変わらずに進行するのである。前項ではウサギ赤血球の MetHb 還元能がきわめて活潑であることを明らかにした。乳酸の増加量は、正常赤血球が両環境中で 5 時間に 20 mg/dl 以上の乳酸を産生するという対照実験と比較するとかなり低値を示すのである。MetHb 還元が活潑におこなわれている血漿環境では乳酸の還元は生成を上回る。もし前もって血漿中に比較的多量に乳酸を含むならば、その乳酸はよく MetHb の還元を利用されることを示す。焦性ブドー酸は乳酸とは対照的に時間の経過と直線関係をもつて増加する。この所見はウサギ赤血球に特異的である。この観察から三炭糖磷酸脱水素酵素あるいは乳酸脱水素酵素作用で生じた DPNH が MetHb 還元利用されていることがわかる。ただし焦性ブドー酸の生成量を MetHb 還元と分子量論的に論ずるにはいくつかの障害を感じた。焦性ブドー酸の増加が血漿環境で著しいことは明らかである。

VIII. ウサギ赤血球の MetHb 還元ならびに解糖作用に及ぼす PCMB の作用

PCMB(パラクロールメルクリ安息香酸塩)は S H 基にきわめて親和性が高く、低濃度でも容易に結合しメルカプチドを形成する。その反応は可逆性であり、PCMB

の S H 基に対する作用は その到達性が高いことから蛋白の “sluggish の S H 基” に対してよく 阻害作用を示す、ある種酵素蛋白の活性にはこの “sluggish の S H 基” の存在が必要であるため本剤はすぐれた S H 酵素阻害剤として用いられる。PCMB による阻害作用はグルタチオンで恢復するという⁴¹⁾。

前記同様処理した MetHb 血球を 1×10^{-3} M PCMB 溶液で 80 分間 incubate したのち、よく洗滌し、以下血漿環境中に $1/4$ 量の MetHb 血球として浮遊させ MetHb の還元と解糖作用を観察した。結果を 3 時間、5 時間に分けて図示すると第 13 図のとおりである。PCMB 処理をおこなわない MetHb 血球と比較するに、解糖系、還元系はともに強く阻害される。しかし解糖系の阻害が比較的早く恢復してくることは 3 時間後の乳酸の生成量が未処理の場合に接近することで明らかである。これに反し還元系は強く阻害されるため恢復はなかなかみられず、3 時間に初めて出現した。焦性ブドウ酸の生成量はほぼ還元と平行した。

Fig. 13 Inhibition of MetHb Reduction by PCMB (Rabbit)

考 察

MetHb の本態は 1924 年 Conant⁴²⁾ により明らかにされ、その後正常赤血球にも含まれることが知られている。ヒト赤血球中の MetHb 含有量は約 1% であり⁴³⁾、このように正常赤血球中にも MetHb が含まれていること

は、循環血液中に取入れられた種々の酸化剤あるいは代謝産物が Hb を酸化し常に MetHb を形成しているためであると考えられる。血液に含まれる還元物質は MetHb を機能型に還元している。そのために赤血球では著しく左に偏した $Hb \rightleftharpoons MetHb$ 平衡が成立しているものと思われる。この還元機序に関する物質として、アスコルビン酸、グルタチオンなどがまず考えられた。Marrison⁴⁴⁾ はグルタチオンが直接に MetHb を還元することを報告しており、同じくチステインの還元作用についても報告がある。特に前者は MetHb の還元が起きている際に減少してくるという観察で支持されている。著者はよく洗滌した MetHb 血球をリンゲル環境で incubate した際に還元がまったく起きないことを観察した。このことは赤血球中にはグルタチオンがかなり多量に含まれているのにも拘らず、このグルタチオンがほとんど利用されていないことを示すものであり、さらにまた環境液中にグルタチオンを加えた場合でも還元を認めることができなかった。これらの所見から赤血球内において MetHb が還元されるのはグルタチオンの働きであると主張する前記の著者の意見を支持することはできない。次に血漿中に含まれるアスコルビンの役割については、主に Hb を機能的状態に保つためにあると考えている研究者が多いが、著者は MetHb 血球をアスコルビン酸加里ンゲル液中に浮遊させた場合、および MetHb の溶血系にアスコルビン酸を添加した場合の実験をおこなった。アスコルビン酸を加えておけば MetHb は還元される。しかし間もなく $Hb \rightleftharpoons MetHb$ 系とアスコルビン酸ニデハイドロアスコルビン酸系とは平衡に達し還元はそれ以上進まなくなる。Lemberg²⁵⁾、Vestling⁴⁶⁾、Gibson⁴⁷⁾、Kiese¹¹⁾ は MetHb が多量である場合ほどアスコルビン酸による還元は大きいこと、またそれ以上アスコルビン酸を大量加えても MetHb 還元を促進することはないなどの観察をしている。著者の実験では単にアスコルビン酸のみを加えたものでは MetHb を完全に消失させることはできないことを観察した。Brooks はウサギに亜硝酸塩を経静脈的に投与し MetHb を形成させた場合にブドウ糖の静脈内投与は MetHb の還元を早めることを認めており、また Drabkin は赤血球内の MetHb が消失するのは血液中のブドウ糖の減少に関連することを示唆している。赤血球中にグリコーゲンが存在しないということはほぼ確実である。吉川⁴⁸⁾ は P^{32} と濾紙クロマトグラフを用い、赤血球中には糖代謝の中間物質としてブドウ糖 6 磷酸、果糖 1,6 二磷酸、2,3 二磷酸グリセリン酸、3 磷酸グリセリン酸、ATP、ADP が含まれることを明らかにしている。

Bartlett⁴⁹⁾は C^{14} グルコースを用い短時間に C^{14} が乳酸に移行することを見出し、赤血球の比較的活潑な解糖作用を論じている。これらの観察から筋肉同様に Embden-Meyerhof 系の存在することは確実である。その他赤血球には特に 2, 3 二磷酸グリセリン酸が多量に含まれることが注目されている⁵⁰⁾。ブドウ糖 6 磷酸分解のもつ 1 つの系路である “oxidative shunt” に関しては, Dickens⁵¹⁾ はウマ赤血球から 6 磷酸グルコン酸およびリボース 5 磷酸脱水素酵素を発見しており, Francoeur⁵²⁾ は溶血系中に非常に活性なブドウ糖 6 磷酸脱水素酵素, 6 磷酸グルコン酸脱水素酵素の存在を確証づけている。TCA 回路は体細胞の呼吸系においては不可欠のものであるが有核赤血球を除いて, 成熟赤血球にはミトコンドリアを有しておらず, したがって TCA 回路系の酵素は存在しないと考えられている。しかしながら Spicer²⁷⁾ は MetHb 血球の環境液にフマル酸, 林檎酸を基質として加える場合でも MetHb の還元を生ずることを報告しており, 正常赤血球中には MetHb 還元のため, このような酵素系が存在しているとも考えられる。この点はまた有核赤血球の遺残酵素で示された所見であるかもしれない。以上を通覧するに成熟赤血球の糖の分解機序の大略は次のとおりである。

環境液中のブドウ糖は赤血球膜を通過し血球内に入り、ついでヘキソキナーゼにより磷酸化されブドウ糖 6 磷酸になる。以下は Embden-Meyerhof 系で果糖 1,6 二磷酸

となり、ついでグリセリンアルデヒド 3 磷酸とデオキシアセトンに解裂する。グリセリンアルデヒド 3 磷酸は三炭糖磷酸脱水素酵素の作用により磷酸グリセリン酸に酸化され、この際、共軛的に DPN⁺ は DPNH に還元される。正常赤血球の場合では、DPNH は焦性ブドウ酸が乳酸に還元される際につかわれるためにその貯積が相殺されているものと考えられる。ブドウ糖 6 磷酸が “oxidative shunt” で酸化されるときには TPN⁺ は還元されブドウ糖-δ-ラクトン 6 磷酸を生ずる。次にグルコン酸は TPN⁺ を還元しさらに脱炭酸されてリブコース 5 磷酸を生ずる。Kiese は Warburg & Christian⁵³⁾ が分離した “Zwischenferment”, あるいは Warburg, Christian & Griese⁵⁴⁾ が赤血球から分離した TPN をヘキソースモノ磷酸とともに incubate したのでは MetHb の還元は非常にわずかであることを観察し、彼が新たにウマ赤血球から分離した co-factor を含む成分は MetHb を還元することを確かめこれを “Hämoglobin Reductase” と名付けている^{11,12)}。Gibson¹³⁾ はブドウ糖リンゲル液環境にメチレン青を添加すると MetHb 還元に伴う磷酸グリセリン酸の増加は未添加の場合と比較しほぼ同じであるに拘らず、MetHb の還元は著しく促進されると報告している。これらの研究者はいずれも MetHb 還元の際に “oxidative shunt” の酵素がかなり重要な働きを有していると考えている。しかし正常赤血球で MetHb が還元される場合のもつとも重要な還元作用は三炭糖磷酸から磷酸グリセリン酸への酸化が起きるとき生ずる DPNH に基づくものであるという考えを著者は支持している。この実験は MetHb の還元と DPNH との関係を考察するために MetHb の還元の際にこの乳酸と焦性ブドウ酸の生成量を測定した。これらの結果をみると、赤血球内で MetHb の還元が盛んに起きているときは焦性ブドウ酸が増加しているが、このことは DPNH が MetHb を還元するために利用されていることを示している。これとは対照的に、ヒト、イヌ赤血球では正常赤血球の場合と同様に乳酸は増加してくる。しかしこれとは逆に焦性ブドウ酸は増加しない。この際の MetHb 還元はきわめてわずかで 5 時間後でさえほとんど認めることができない。前述したように Kiese は TPNH と MetHb 間の酸化還元にはさらに介在する因子の存在することを証明しており、Gibson¹³⁾ は先天性メトヘモグロビン血症患者血球には DPNH と MetHb 間に必要な co-factor I が欠けているのであると考えている。著者はこの実験で、解糖作用が旺盛であるということが必ずしも MetHb の還元を早めるのではないことを知りえた。例えば、MetHb

が大量に形成されている場合でもかなり乳酸は増加してくるのであり、できた DPNH はごく一部分が MetHb の還元利用されているにすぎないことが、乳酸と焦性ブドウ酸の生成量で推測できた。これらの事実から DPNH と MetHb 間にはさらに必要な因子が存在し、その機能には一定の限界が考えられる。溶血系で還元がみられないということは、赤血球内の酵素系を知ろうとする面で著しく不利である。PCMB で処理した赤血球では MetHb 還元が著しく阻害されることは、MetHb 還元機序において -SH 基の関与がきわめて重要であることを示唆している。PCMB 阻害からの恢復に際しては、まず解糖系に恢復がみられ、しばらく遅れて MetHb の還元が現われてくるのである。峯岸⁵⁵⁾は PCMB 処理赤血球の酸素消費が完全に抑えられること、恢復にはかなりの時間を要することを観察しており、これらの知見から考えると解糖系酵素に比較し MetHb 還元側に必要な酵素系が少いものと考えられる。Sivers & Ryon⁵⁶⁾はヒト赤血球を用い血漿環境と 0.85 % NaCl 環境で MetHb の還元速度を比較しているが、この場合に両環境での差はみられていない。著者はウサギ赤血球の解糖作用を血漿環境とブドウ糖リンゲル液環境で観察し、両環境の間に差のないことをみている。しかし MetHb 血球の場合の解糖作用は血漿環境では焦性ブドウ酸が著明に増加し、乳酸はかえって減少の傾向を示している。一方ブドウ糖リンゲル液環境ではこのような変化がわずかみられるにすぎない。MetHb の還元速度は上記の傾向と平行し、血漿環境では 3 時間後に実にその 90% が還元される。血漿環境でのみこのように解糖作用と MetHb 還元の相互作用が合目的に促進されることは注目すべき所見である。

Lester⁵⁷⁾あるいは Heubner⁵⁸⁾は、草食動物の赤血球が MetHb の形成に対し非常に抵抗の強いことを報告しているが、著者はこれらの実験から、草食動物の赤血球は還元能が大きいために形成した MetHb はすぐ還元され、したがって弱い MetHb 形成物質の投与ではなかなか MetHb をつくることのできないのであると考えている。

総 括

1) ウサギ血液に亜硝酸塩を添加すると MetHb が形成される。この血液を 37°C 恒温槽中で incubate すると 5 時間後 MetHb はすべて還元され Hb に戻る。しかしもしこの血液から血漿を除き、その代りとして環境液にリンゲルを加えると MetHb の還元はみられない。

2) 血漿環境でみられるこの MetHb 還元は血漿中に

含まれるアスコルビン酸のような還元物質によるものではない。

3) リンゲル液にブドウ糖、乳酸を加えると MetHb の還元はやや進行する。

4) MetHb 還元機序における血漿中のブドウ糖、乳酸の意義を検討した。

a) 酵母であらかじめ血漿中のブドウ糖を分解しておけば未処理血漿の還元速度と比較し 78% 阻害される。

b) 2×10^{-3} M モノヨード酢酸の添加は 55 % 阻害する。

c) 0.01 M 弗化アンモニウムの添加は約 20% 阻害する。

d) 血漿にブドウ糖をさらに添加しても還元速度は変わらない。

5) リンゲル、ブドウ糖リンゲル、果糖 1.6 ぢ磷酸リンゲル、血漿環境中で MetHb 血球をサポニンで溶血し、礫質を除いた溶血系で実験するといずれも MetHb 還元は現われない。DPN を様々な濃度で 200 mg/dl 果糖 1.6 ぢ磷酸溶液に加え、この環境液中で MetHb 血球を溶血し礫質を除いたものを用いると MetHb の還元はいずれも現われない。

6) ウサギ赤血球の好氣的条件下の解糖作用をブドウ糖、乳酸、焦性ブドウ酸の面から観察した。正常赤血球の解糖作用を血漿環境と 200 mg/dl ブドウ糖リンゲル環境とで比較するに、乳酸と焦性ブドウ酸の量からはその差を認められない。赤血球が多量の MetHb を含んでいると血漿環境下のブドウ糖消費、焦性ブドウ酸の増加はブドウ糖リンゲル環境と比較し著しく大きく、一方乳酸の増加は抑えられる。

7) ヒト、イヌ、ウサギ赤血球の MetHb の還元速度はウサギのみ速やかである。MetHb の還元が完全に進むには環境液が血漿でなければならない。

8) ヒト、イヌ、ウサギ赤血球内の MetHb 還元の観察と平行して、環境液中の乳酸と焦性ブドウ酸の量を比較すると、ヒトおよびイヌでは乳酸は増加し、焦性ブドウ酸は増加してこない。ウサギでは焦性ブドウ酸が目立って増加し、乳酸はやや減少する。

9) 以上を総括すると、ウサギ赤血球のみは MetHb を速やかに消失することができるが、この性質を示すためには環境液は血漿でなければならない。解糖作用を障害するような操作を加えると還元は抑えられる。MetHb 還元に伴ない焦性ブドウ酸が増加することは、三炭糖磷酸と乳酸の酸化が一部利用されることを示す。

10) この還元作用が PCMB のとき S H 基阻害剤

で完全に抑制される点から, MetHb の還元機序にグロビンSH基が関与しその反応にあずかる役割は重要なものとする。

撰筆するに当り, 御指導と御校閲を賜った竹村望助教授に衷心より感謝の意を表します。

文 献

- 1) 折田 穎 他: 産科と婦人科, 23, 1083, 1956.
- 2) Wintrobe: Clinical Hematology, 3rd Edition, p. 146.
- 3) 久保田重孝: 最近の職業病, p. 178, 181, 188, 山水社, 1953.
- 4) Lian, C., Frumusan, P. and Sassier: Bull. et mém. méd. d. Soc. hop. de Paris, 55, 1194, 1939.
- 5) Deeny, J., Murdock, E. T. and Rogan, J. J.: Brit. M. J., 1, 721, 1943.
- 6) Hauschild, F.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., 184, 458, 1937.
- 7) Wendel, W. B.: J. Clin. Investigation, 18, 179, 1938.
- 8) Bodansky, O. and Gutmann, H. R.: J. Pharmacol. & Exper. Therap., 90, 45, 1947.
- 9) Mangelsdorff, A. F.: Arch. Ind. Health, 4, 148, 1956.
- 10) Kiese, M.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., 204, 288, 1947.
- 11) Kiese, M.: Biochem. Ztschr., 316, 264, 1943.
- 12) Kiese, M. und Weis, B.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., 202, 493, 1943.
- 13) Gibson, Q. H.: Biochem. J., 42, 13, 1948.
- 14) Gutmann, H. R., Jandorf, B. J. and Bodansky, O.: J. Biol. Chem., 169, 145, 1947.
- 15) Vierordt, K.: Die Anwendung des Spectralapparates zur Photometrie der Absorptionsspektren und zur quantitativen chemischen Analyse Tuebingen, 1873, 16) より引用.
- 16) Michel, H. O. and Harris, J. S.: J. Lab. & clin. Med., 25, 445, 1940.
- 17) Stadie, W. C.: J. Biol. chem., 41, 237, 1920.
- 18) Somogyi, M.: J. Biol. Chem., 160, 69, 1954.
- 19) Barker, S. B. and Summerson, W. H.: J. Biol. Chem., 138, 535, 1941.
- 20) Friedmann, T. E. and Haugen, G. E.: J. Biol. Chem., 147, 415, 1943.
- 21) 藤井暢三: 生化学実験法 定量篇, p. 420, 南山堂, 1956.
- 22) Bidmead and Watson: J. Clin. Path., 5, 30, 1952.
- 23) Borsook, H. and co-workers: J. Biol. Chem., 117, 237, 1937.
- 24) Ball, F. W. and Lehninger, A. L.: J. Biol. Chem., 194, 119, 1951.
- 25) Lemberg, R., Legge, J. W. and Lockwood, W. H.: Biochem. J., 35, 339, 1941.
- 26) Wendel, W. B.: J. Biol. Chem., 102, 373, 1933.
- 27) Spicer, S. S. and Clark, A. M.: J. Biol. Chem., 179, 987, 1949.
- 28) 上代皓三 他: 血色素の生理と臨床, p. 462, 医学書院, 1958.
- 29) Haurowitz, F.: Biochemistry and Introductory Textbook (吉川春寿訳), p. 73, 朝倉書店, 1958.
- 30) 吉川春寿: 臨床医化学 I 実験篇, p. 148, 協同医書, 1955.
- 31) Brooks, M. M.: Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 32, 63, 1934.
- 32) Cox, W. W. and Wendel, B. W.: J. Biol. Chem., 143, 331, 1942.
- 33) White et al.: Principle of Biochemistry p. 423 McGraw-Hill Inc., 1954.
- 34) Shapot, V. S.: Biokhimiya, 3, 430, 1930.
- 35) Drabkin, D. L.: Federation Proc., 5, 132, 1946.
- 36) Tullis, J. L. et al.: Blood Cells and Plasma Proteins, p. 238, Academic Press Inc. N. Y., 1953.
- 37) 大木幸介: 細胞量子化学, p. 71, 南江堂, 1957.
- 38) Haurowitz, F.: 前掲書, p. 112
- 39) Tullis, J. L. et al.: 前掲書, p. 246
- 40) 本松深一: 福岡医学, 46, 923, 1955.
- 41) 平出順吉郎: SH の進歩, p. 53, 医学書院, 1954.
- 42) Conant, J. and Fieser, L. F.: J. Biol. Chem., 62, 595, 1924.
- 43) Bodansky, O.: Pharmacol. Rev., 3, 196, 1951.
- 44) Marnson, D. B. and Williams, E. F.: Science, 87, 15, 1938.
- 45) Duesber, R. und Koll, K.: Arch. exper. path. Pharmacol., 1162, 296, 1931.
- 46) Vestling, C. S.: J. Biol. Chem., 143, 439, 1942.
- 47) Gibson, Q. H.: Biochem. J., 37, 115, 1943.
- 48) 上代皓三 他: 前掲書, p. 462.
- 49) Bartlett, G. R. and Marlow, A. A.: J. Lab. chem. Med., 42, 178, 1953.
- 50) Guest, G. M. and Rapoport, S. J. Biol. Chem., 123, XIVII, 1938.
- 51) Dickens, F.: Biochem. J., 32, 1626, 1938.
- 52) Tullis, J. L. et al.: 前掲書, p. 229.
- 53) Warburg, O. und Christian, W.: Biochem. Ztschr., 242, 206, 1931.
- 54) Warburg, O., Christian, W. und Griese, A.: Biochem. Ztschr., 282, 157, 1935.
- 55) 峯岸薫: 日本衛生学雑誌, 13(4), 573, 1958.
- 56) Sivers, R. and Ryon, J. B.: Arch. Intern. Med., 76, 299, 1945.
- 57) Lester, D.: J. Pharmacol. Exper. Therap., 77, 154, 1943.
- 58) Heubner, W.: Arch. f. exper. Path. u. Pharmacol., 72, 240, 1913.

(受付: 1958年8月1日, 特別掲載)