黒部市民病院内科 大桑 仁◇ 高桜英輔 寺田康人 牧野 博

金沢大学附属医療短期大学 谷島清郎

金沢大学医学部第一生化学 米山良昌

概要 Cytochrome b_5 還元酵素欠損による遺伝性メトヘモグロビン血症の兄弟例2例を経験し、家族調査も施行した。症例1. 男, チアノーゼの精査目的に当科入院。メトヘモグロビン量24%と高く, Kaplanの方法によるcytochrome b_5 還元酵素活性染色で, 酵素活性が欠除していた。症例2は兄で, 酵素活性が欠除し, 父母は対照より薄く染色され, 活性が低値と考えられた。他の親族を含め, NADH-diaphorase, Hegeshらのferrihemoglobin還元酵素活性を測定すると, 父母, 父方の祖母, 叔父, 母方の祖父, 叔母の1人, 叔父が患者と正常者の中間値を示し, heterozygoteと考えられた。cytochrome b_5 還元酵素に関し家系調査を行なったのは本邦初と考え報告した。

〔日内会誌 75: 426~430, 1986〕

はじめに

遺伝性メトヘモグロビン血症には, ヘモグロビンの異常によるヘモグロビンM症と, 遺伝性に赤血球内のメトヘモグロビン還元酵素を欠くものがあり, 後者は最近になって, Hultquist¹⁾, Sugitaら²⁾により, cytochrome b_5 還元酵素の欠損であることが明らかにされた。今回, われわれは, メトヘモグロビン血症を呈した兄弟例2例を経験し, 家族を含めメトヘモグロビン還元酵素活性に関し詳細な検討を行なう機会を得たので報告する。

症 例

症例1. 18才, 男性。

主訴: チアノーゼの精査。

既往歴: 特記すべきことなし。

家族歴: 図1のごとくで, 父方の祖母と母方の祖父は遠い血縁関係になると言うが詳細は不明である。

現病歴: 在胎10カ月に正常頭位分娩で出生し, 生下時, 体重は2850gであつた。生下時よりチアノーゼを認め, 某大学病院小児科へ入院したが,

心臓に異常を認めず, メトヘモグロビン血症と診断された。以後発育は正常で, 中学時代には野球部に所属し, 人並みの運動は可能であつた。昭和59年3月23日, 自衛隊入隊の際, 検診にてチアノーゼを指摘され, 精査のため当科を受診した。

入院時現症: 身長170cm, 体重59kg, 知能障害は認めない。皮膚はやや暗色で, 頬, 口唇, 指尖にチアノーゼを認める。血圧106/74mmHg, 脈拍80/分, 整, 心濁音界拡大なし, 心音はI音, II音とも正常で, III音とLevine I度の収縮期雑音を聴取する。肝脾腎は触知せず, 神経学的には異常を認めない。

検査成績: 胸部X線像, 心電図, 断層心エコー図では異常を認めず, コントラストエコー法, 色素希釈曲線でも右一左短絡は認められなかつた。一般血液検査では, 赤血球554万/mm³, 血色素16.1g/dlと赤血球増加症を示した。血液ガスは正常であつた(表1)。Van Assendelf法によりメトヘモグロビンを測定すると24.0%と増加していた。患者血液をpH6.8のリン酸緩衝液で希釈し分

〔昭和60年3月20日受稿〕

A familial study of methemoglobinemia

Hitoshi OHKUWA, Eisuke TAKAZAKURA, Yasuhiro TERADA and Hiroshi MAKINO, Department of Internal Medicine, Kurobe Municipal Hospital, Kurobe. Kiyoh TANISHIMA, Department of Medical Technology, Kanazawa University Paramedical School, Kanazawa.

Yoshimasa YONEYAMA, The First Department of Biochemistry, Kanazawa University School of Medicine, Kanazawa

図 1. 家系図

表 1. 症例 1 の一般検査成績

末梢血		GOT	10	KU
白血球	5300/mm ³	GPT	8	KU
赤血球	554×10 ⁴ /mm ³	γ-GTP	8.8	mU/ml
Hb	16.1 g/dl	ALP	5.7	KAU
Hct	51.0 %	LDH	212	U
血小板	17.6×10 ⁴ /mm ³	メトヘモグロビン	24	%
生化学		血清学		
総蛋白	7.3 g/dl	CRP	(-)	
アルブミン	69.9 %	RA	(-)	
γ-グロブリン	9.2 %	血液ガス		
BUN	10.5 mg/dl	PH	7.39	
クレアチニン	0.8 mg/dl	PaO ₂	95.2	mmHg
Na	146 mEq/l	PaCO ₂	39.7	mmHg
K	4.3 mEq/l	HCO ₃	24.0	mEq/l
Cl	107 mEq/l

図 2. 症例 1 の溶血液吸収曲線

光光度計により吸収曲線を描かせると、630nmにメトヘモグロビンの峯を認め、ヘモグロビンM症は否定的であつた(図2)。

以上より酵素欠損によるメトヘモグロビン血症を疑い、Kaplanら³⁾の方法に準じ、患者溶血液について等電点電気泳動法による酵素活性染色を施行した。図3左は、基質電子受容体として0.1mM 2,6-dichlorophenolindophenol (DCIP)を用い、1mM還元型nicotinamide adenine dinucleotide (NADH)、0.5mg/ml 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide (MTT)を加えNADH-diaphorase活性をみたもの、右は電子受容体としてDCIPのかわりにウサギ肝ミクロゾームより得たcytochrome b₅を用い、NADH-cytochrome b₅還元酵素活性をみたものであるが、両者とも図の矢印で示すごとく正常コントロールにみられるbandを欠いていた。このbandは、cytochrome b₅を電子受容体とした染色から明らかなようにcytochrome b₅還元酵素と考えられ、NADH-diaphoraseについても、このcyto-

図 3. 等電点電気泳動法による酵素活性染色。A: NADH-diaphorase活性。B: NADH-cytochrome b₅還元酵素活性。C: コントロール。P: 症例1。

chrome b₅還元酵素活性に対応するbandだけが欠損していた。

入院後経過: 特効薬であるメチレンブルー200mg/日の投与を試みた。効果は著明で翌日にはチアノーゼが消失し、4日目にはメトヘモグロビ

表2. 症例2の一般検査成績

末梢血		クレアチニン	0.9 mg/dl
白血球	6000/mm ³	Na	141 mEq/l
赤血球	550×10 ⁴ /mm ³	K	4.0 mEq/l
Hb	17.3 g/dl	Cl	102 mEq/l
Hct	51.5 %	GOT	8 KU
血小板	20.0×10 ⁴ /mm ³	GPT	5 KU
生化学		γ-GTP	5.7 mU/ml
総蛋白	7.3 g/dl	ALP	4.6 KAU
アルブミン	69.3 %	LDH	220 U
γ-グロブリン	14.7 %	メトヘモグロビン	25.3 %
BUN	14.9 mg/dl		

ン量も3.5%まで減少したが、8日目頃より再度口唇、手指に軽いチアノーゼを認め、メトヘモグロビン量も10%まで増加した。特に副作用を思わせる自他覚所見を認めなかつたが、いつたんメチレンブルー投与を中止し、以後外来にてリボフラビンを経口投与することとした。

症例2. 20才、男性、症例1の兄である。

現病歴： 弟同様生下時よりチアノーゼを認めたが、発育は正常で特に自覚症状もない

身体所見： 頬、口唇、指尖にチアノーゼを認める以外特記すべき所見はない。

検査成績： 胸部X線像、心電図、断層心エコー図はいずれも正常で、一般検査成績では弟同様、赤血球550万/mm³、血色素17.3g/dlと赤血球増加症を認めた(表2)。メトヘモグロビン量は25.3%と高く、吸収曲線は630nmに峯を認めた。等電点電気泳動法では、cytochrome b₅還元酵素の欠損を認めた。

家族調査

患者を含む11名の親族について、酵素活性を検討した。図4は症例1, 2, 父、母および正常コントロールについて、cytochrome b₅還元酵素活性染色を施行したものであるが、症例1, 2は酵素活性を欠いており、また写真上は不鮮明であるが、父母は明らかに薄く染色され、cytochrome b₅還元酵素活性が低値であると考えられた。

次に他の親族を含め、Sugitaら²⁾の方法によるNADH-diaphorase活性、Hegeshら⁴⁾の方法によるferrihemoglobin還元酵素活性、および他の解糖系酵素として、Beutler⁵⁾の方法により、glucose 6

図4. 等電点電気泳動法によるcytochrome b₅還元酵素活性染色。1: 症例1, 2: 症例2, 3: 父, 4: 母, 5: コントロール

表3. 症例1, 2および家族の酵素活性

	DIAPHORASE (nmol/min/mgHb)	HEGESH UNITS
I-1	0.4	1.1
I-3	2.6	4.1
I-4	1.3	2.3
II-2	0.9	2.0
II-3	1.4	1.6
II-5	1.5	2.1
II-6	1.1	2.1
II-7	2.0	4.5
II-8	1.3	1.9
III-1	0.7	0
III-2	0.8	0
normal control	2.9	3.0
normal range (sample size)	2.9 ± 0.8 (14)	4.1 ± 1.1 (14)

リン酸脱水素酵素(G6PD)の活性も測定した。症例1, 2ともNADH-diaphorase活性は著明に低下し、また、ferrihemoglobin還元酵素活性は全く認められなかつた。他の家族はチアノーゼを認めず、メトヘモグロビン量も正常であつたが、父母を含め、父方の祖母、母方の祖父、父方の叔父、

母方の叔父、叔母の一人で、両酵素活性が低値なしい患者と正常者の中間値をとり、酵素活性に関してheterozygoteと考えられた(表3)。G6PD活性は全例でコントロール値と差を認めなかった。

考 案

心、肺疾患以外の原因で先天性チアノーゼを生ずることは19世紀半ばより知られていたが、近年まで原因がはつきりしていなかった。1959年、本邦でも相次いで特発性メトヘモグロビン血症の報告がなされたが^{9)~7)}、酵素活性についての検討はなされていない。

一方、同じく1959年にScottら⁸⁾は、NADHによりメトヘモグロビンを還元する酵素(NADH-diaphorase)を同定し、遺伝性メトヘモグロビン血症の患者では、この酵素活性が著明に低下していることを明らかにした。また翌年、アラスカエスキモーとイングリックインディアンを対象に、NADH-diaphorase活性に関し広範な家系調査を行ない、メトヘモグロビン血症患者の両親では、酵素活性が患者と正常者の中間値を示すことを見出した⁹⁾。Scottらは、患者両親は酵素活性に関しheterozygoteであろうとし、家系調査からも遺伝形式は常染色体劣性遺伝であろうと推察した。以来、本邦でも河北ら^{10)~11)}の沖縄での12家系の報告をはじめとして、本酵素についての検討を加えたメトヘモグロビン血症の報告がいくつか見られるようになった^{12)~14)}。今回のわれわれの検討でも、両親以外に叔父、叔母、父方の祖母、母方の祖父にNADH-diaphorase活性の低下を認め、Scottらの言うようにheterozygoteと考えられ、また家系図から明らかなように、遺伝形式は常染色体劣性遺伝であると思われた。

Scottらは後に酵素を精製し、diaphorase IおよびIIを同定し、メトヘモグロビン血症ではIが欠損しているとしたが^{15)~16)}、このdiaphorase Iは、電子受容体としてDCIPを用いた場合の酵素活性は強いが、肝腎のメトヘモグロビンを還元する活性はその千分の一と弱く、in vivoでのメトヘモグロビン還元を説明できないため、天然の電子伝達体が求められた。

1967年、Hegeshら¹⁷⁾は、ヒト赤血球よりferricyanideを加えると非常に速くメトヘモグロビンを還元する酵素を精製し、これをferrihemoglobin還元酵素と呼んだ。この酵素活性は、検体のヘモグロビン含量に影響されず、NADH-diaphorase活性に比し、正常者と活性低下例で値に重なりがなく、homozygoteとheterozygoteも明瞭に識別できるため臨床的に応用された⁴⁾。今回の検討でも、症例1, 2はともに酵素活性を全く認めず、父母、叔父、叔母、祖父母は患者と正常者の中間値を示し、NADH-diaphoraseに比し、homozygoteとheterozygoteの識別が容易であつた。

1971年になり、HultquistおよびPassonら¹⁾は、ヒト赤血球より天然の電子伝達体であるcytochrome b_5 およびcytochrome b_5 によりメトヘモグロビン還元能を高める酵素、すなわちcytochrome b_5 還元酵素を精製することに成功した。この酵素はすみやかにcytochrome b_5 、DCIP, ferricyanideを還元し、また、メトヘモグロビンの還元そのものは非常に遅いが、生理的濃度のcytochrome b_5 を添加することにより70倍以上の活性促進を示す。以上より、この酵素が、生体内でのメトヘモグロビン還元にたずさわる主な経路と考えられた。Hultquistらはメトヘモグロビン還元機構を、NADH→cytochrome b_5 還元酵素→cytochrome b_5 →メトヘモグロビンとしている。

同じく1971年、本邦でもSugitaら²⁾により、このヒト赤血球cytochrome b_5 還元酵素が精製確認され、以来、遺伝性メトヘモグロビン血症の患者で本酵素に関し検討がなされるようになった¹⁸⁾¹⁹⁾。しかし、現在まで本邦でこの酵素に関して家族調査を行なつた報告はなく、本酵素による検討が必要とされてきた。今回われわれはKaplanら³⁾の等電点電気泳動法にてcytochrome b_5 還元酵素活性を検討したが、症例1, 2で、酵素欠損を認めるとともに、父母に関しても酵素活性が低値で本酵素活性に関してheterozygoteであることが明らかであつた。

結 語

メトヘモグロビン血症の兄弟例2例を経験し、

cytochrome b₅還元酵素の欠損を確認した。家族についても同酵素の検討を行ない、酵素活性についてheterozygoteであることを明らかにした。本酵素に関し家族調査を行なつたのは本邦初と考え報告した。

文 献

- 1) Hultquist DE and Passon PG: Catalysis of methemoglobin reduction by erythrocyte cytochrome b₅ reductase. *Nature N Biol* 229: 252, 1971.
- 2) Sugita Y, et al: Purification of reduced pyridine nucleotide dehydrogenase from human erythrocytes and methemoglobin reduction by the enzyme. *J Biol Chem* 246: 6072, 1971.
- 3) Kaplan JC and Beutler E: Electrophoresis of red cell NADH- and NADPH-diaphorases in normal subjects and patients with congenital methemoglobinemia. *Biochem Biophys Res Commun* 29: 605, 1967.
- 4) Hegesh E, et al: New method for determining ferrihemoglobin reductase (NADH-methemoglobin reductase) in erythrocytes. *J Lab Clin Med* 72: 339, 1968.
- 5) Beutler E: Red cell metabolism, a manual of biochemical methods. Grune & Stratton Inc, New York, 1975, p66.
- 6) 曲直部寿夫, 他: 特発性メトヘモグロビン血症の二例. *日本臨床* 17: 1088, 1959.
- 7) 上田英雄, 他: 特発性メトヘモグロビン血症の臨床的ならびに生化学的検討. *内科* 4: 1155, 1959.
- 8) Scott EM and Griffith IV: The enzymic defect of hereditary methemoglobinemia: Diaphorase. *Biochim Biophys Acta* 34: 584, 1959.
- 9) Scott EM: The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. *J Clin Invest* 39: 1176, 1960.
- 10) Tokesi H, et al: Studies on the congenital methemoglobinemia in Okinawa Island I. Case report. *Kumamoto Med J* 17: 182, 1964.
- 11) Kawakita Y, et al: Studies on the congenital methemoglobinemia in Okinawa Island II. Diaphorase activity. *Kumamoto Med J* 19: 211, 1966.
- 12) 青山進午, 他: 先天性メトヘモグロビン血症の1例. *臨床血液* 9: 613, 1968.
- 13) 仁科甫啓, 他: Hereditary methemoglobinemiaの1例—xylitol, sorbitol代謝とメトヘモグロビン還元機構—. *日血会誌* 33: 455, 1970.
- 14) 瀧野辰郎, 他: 遺伝性メトヘモグロビン血症の1家系. *代謝* 19: 289, 1982.
- 15) Scott EM and McGraw JC: Purification and properties of diphosphopyridine nucleotide diaphorase of human erythrocytes. *J Biol Chem* 237: 249, 1962.
- 16) Scott EM, et al: The reduced pyridine nucleotide dehydrogenases of human erythrocytes. *J Biol Chem* 240: 481, 1965.
- 17) Hegesh E and Avron M: The enzymatic reduction of ferrihemoglobin II. Purification of a ferrihemoglobin reductase from human erythrocytes. *Biochim Biophys Acta* 146: 397, 1967.
- 18) Kitao T, et al: Methemoglobin reductase (cytochrome b₅ reductase) deficiency in congenital methemoglobinemia. *Blood* 44: 879, 1974.
- 19) Hirano M, et al: Congenital methemoglobinemia due to NADH methemoglobin reductase deficiency: Successful treatment with oral riboflavin. *Brit J Haematol* 47: 353, 1981.