

Acatlasemia 症における Heinz 小体性 溶血に関する研究

川崎医科大学 血液内科

八 幡 義 人

同 耳鼻咽喉科

高 原 滋 夫

(昭和59年9月26日受付)

Hemolysis of Acatlasemic Red Cells with Increased Heinz Body Formation

Yoshihito Yawata

Division of Hematology, Department of Medicine,
Kawasaki Medical School

Shigeo Takahara

Department of Otorhinolaryngology, Kawasaki Medical School

(Accepted on September 26, 1984)

Acatlasemia 症では、赤血球 catalase 活性が全欠損している症例でも、赤血球溶血は認められないものと考えられている。しかし、この従来の見解に反して、本研究では catalase 活性欠乏赤血球では、*in vitro* 法による Heinz 小体生成試験の強陽性所見ならびに ascorbate 試験の著明な異常所見を認めた。そこで、これらの異常を惹起する可能性のある5炭糖リン酸回路活性を本症患者赤血球について検索したところ、正常所見を得た。したがって、この Heinz 小体試験、および ascorbate 試験の異常成績は、これら赤血球における catalase 欠乏に起因する可能性が極めて高い。これらの catalase 欠乏赤血球では、酸化環境下において溶血を生ずることが考えられることから、酸化剤投与、感染症罹患などを回避すべきであろう。

It is commonly believed that there is no hemolysis in the red cells of patients with acatalasemia. Contrary to this commonly held belief, acatalasemic red cells we observed showed a marked increase in Heinz body formation and extremely abnormal results in the ascorbate test. The activities of the pentose phosphate shunt pathway and of glycolysis were generally normal. Thus, the abnormality observed probably should be attributed to the deficient catalase in these red cells, followed by their hemolysis under oxidative stress. Such acatalasemic patients, therefore, should be protected from oxidative challenge by oxidative drugs or

infections.

Key Words ① Acatalasiaemia ② Heinz body ③ Hemolytic anemia

緒 言

最近十数年間に、溶血性貧血の病因に関する研究は長足の進歩を遂げ、特に赤血球酵素欠乏症に伴う溶血性貧血^{1),2)}症例が多数報告されている。これらの諸酵素欠乏症においては、それに合併する溶血または溶血性貧血との関連についてはいまだ十分に説明されているとは言い難く、今後の重要な課題として残されている。³⁾いくつかの酵素欠乏症、たとえば lactic dehydrogenase 欠乏症^{4),5)}や、NADH methemoglobin reductase 欠乏症⁶⁾などでは、酵素欠乏症が確認されているながら、溶血症状を伴わないことが知られている。

ところで、これらの赤血球代謝障害の病因が赤血球酵素欠乏症にあることが初めて発見されたのは1947年、本邦の高原による acatalasemia⁷⁾⁻⁹⁾であろう。Catalase^{10),11)}は、ヒト成熟赤血球においては、glutathione, glutathione reductase, glutathione peroxidase, superoxide dismutase などとともに、酸化環境において、赤血球代謝を正常に維持する上で、重要な役割を担っているものと考えられ、その一部は既報した。¹²⁾

すなわち catalase は glutathione peroxidase (GSH-PX) と共に生体内の解毒、特に過酸化水素の分解に重要な作用を有すると言われている。この場合、生理的あるいは微量の H_2O_2 は GSH-PX により、また大量に生じた H_2O_2 の場合は主として catalase により処理される。 H_2O_2 は脂質、膜蛋白、hemoglobin, 酵素蛋白などに対して酸化作用をもつものとして有害であることは良く知られている。Aebi によると、catalase は、その作用は H_2O_2 濃度に依存しており、高濃度の H_2O_2 存在下では H_2O_2 の分解作用が主体であり、一方、低濃度の H_2O_2 ($10^{-6}M$ 以下) の場合、あるいはたとえ H_2O_2 が生じてもその水素の受け入れが可能である場合には、むしろ peroxidase としての

作用を有すると言われる。Aebi らは本症患者赤血球にレ線照射を行ったところ、正常赤血球に比較して、methemoglobin 濃度は10~20倍に亢進し、微量の catalase 添加により、この異常は消失したと報告している。

Catalaseに関するこれらの重要な作用が報告されている一方、本酵素欠乏症(acatalasemia)では、赤血球の catalase 活性をほとんど全く欠如しているにもかかわらず、通常の臨床観察では溶血は認められず、¹³⁾また、発見の契機となった口腔内重症感染症の場合も、感染症が存在しない限り、酵素欠乏症がありながら、生体には何ら特別な意義を有しないかのごとく従来より考えられている傾きがある。

しかし、仔細に臨床観察を行うと、本症患者が感染症に罹患したり、手術ストレスに曝露されたりする際には、末梢血において軽度ながら、methemoglobin 量の増加、時に貧血の出現が認められる。

そこで本研究では、acatalasemia の成人3症例につき、その赤血球代謝、特に酸化還元能について検討し、あわせてその臨床的意義について考察を加えた。

検体および方法

本症患者3例(catalase 活性はいずれも正常対照の1%以下)、および正常対照4例につき、ヘパリンにより静脈採血を行い、全血の一部について、血液学的一般検査その他を施行した。また、全血の残部を2,000 r.p.m., 20分間の遠心により buffy coat を除去し、赤血球を等張 Na/K 磷酸緩衝食塩水(glucose 濃度125 mg%)にて3回洗浄することにより、洗浄赤血球浮遊液を作成し、hematocrit を30%に調製した。¹⁴⁾

全血2ccに sodium ascorbate 10mg, glucose 5mg を加えたのち、37°C, 3時間孵置することにより ascorbate 試験を施行し、生じた

sulfhemoglobin 量 (O. D. 620 nm) を測定した。^{15), 16)}

また, Heinz 小体生成試験¹⁷⁾ は Jandl らの方法で, さらに還元型 glutathione 定量¹⁸⁾ は Beutler らの方法により各々行った。

赤血球 pentose 回路活性の測定¹⁹⁾ は ¹⁴C-U-glucose (Amersham Searle #CFB 96, England) または ¹⁴C-1 glucose (同, #CFA 349) を赤血球浮遊液に加え, 37°C 4時間孵置した後, 生じた ¹⁴CO₂ を hyamine に吸着させ, その ¹⁴CO₂ 生成能 ($\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2 \text{ produced/hour/ml RBC}$) をもって五炭糖回路活性とした。その際, 一部の実験では, 10⁻¹⁴ M methylene blue を添加し, 五炭糖回路を賦活化 (stimulated) させ, 一方, methylene blue 無添加 (basal) を対照とした。

次に本症患者赤血球の解糖能については, その全体 (overall activity) を把握する目的で, 上記赤血球浮遊液を 37°C 2時間孵置した後, 10%, perchloric acid により除蛋白しその上清について, glucose,²⁰⁾ lactate²¹⁾ および pyruvate²²⁾ を各々酵素法により測定した。

また, 赤血球解糖中間体の中で最大濃度を有する 2, 3-diphosphoglycerate についても, Keitt²³⁾ の方法により定量を行った。

成 績

(1) 血液学的一般所見

検索に使用した本症患者 3 例と正常対照 4 例の赤血球所見については, **Table 1** に掲げた。本症例のうち, 第 3 症例では軽度の貧血を認めるが, M. C. V., M. C. H. はともに低下していることから microcytic hypochromic anemia であり, 鉄欠乏性貧血の合併が示唆される。これら 3 症例ではいずれも網状赤血球増多症は認められていない。

(2) Ascorbate test

本症患者 (第 1 例) と正常対照 2 例 (第 1 例および第 2 例) に関する成績では, 孵置開始後 30 分で既に著明な sulfhemoglobin 生成亢進を認め, 2 時間の時点で, その hemoglobin は変

Table 1. Hematological data in red cells of peripheral blood of acatalasemic patients.

	Normal	Patients
(I) Red cells ($\times 10^4/\mu\text{l}$)	1. 493	1. 442
	2. 447	2. 487
	3. 521	3. 376
	4. 495	4. —
	Mean	489
(II) Hemoglobin (g/dl)	1. 14.5	1. 14.5
	2. 13.4	2. 16.6
	3. 17.1	3. 10.4
	4. 16.6	4. —
	Mean	15.4
(III) Hematocrit (%)	1. 43.2	1. 42.7
	2. 38.7	2. 48.5
	3. 46.9	3. 30.0
	4. 46.0	4. —
	Mean	43.7
(IV) Reticulocyte (%)	1. 0.7	1. 1.6
	2. 0.7	2. 0.8
	3. 1.3	3. 0.5
	4. 1.6	4. —
	Mean	1.1

性沈殿を生ずるようであった。

その他の本症患者 (第 2 症例および第 3 症例) の成績をもあわせて, **Table 2** に掲げた。本症患者赤血球におけるこの ascorbate test の異常所見は正常対照に比較して非常に顕著であり, 本症患者赤血球が酸化環境において, ヘモグロビンの変性沈殿を生じやすいことを示している。なお, これらの本症患者はいずれも, そのヘモグロビン組成に異常はみられていない。

(3) Heinz 小体生成試験

本症患者赤血球の酸化環境下における易酸性性を検討する目的で, Heinz 小体生成試験を行い, その成績を **Table 2** に示した。

Acetylphenylhydrazine 負荷により, 患者赤血球はそのほとんど全て (平均 97%) が Heinz 小体 5 個以上を含むようになり, 正常対照 (平

Table 2. The activities of oxydation and reduction in red cells of the patients with acatalasemia.

(I) Heinz body formation

Normal		Patients	
1.	25%	1.	96%
2.	48	2.	98
3.	30	3.	98
4.	38		
Mean	35		97

(II) Ascorbate test (O. D. at 620m μ)

Normal		Patients	
1.	.083	1.	.823
2.	.091	2.	.725
3.	.087	3.	.750
4.	.088		
Mean	.087		.766

(III) Reduced glutathione

Normal		Patients	
1.	88.0 mg%	1.	81.7 mg%
2.	83.9	2.	91.1
3.	76.6	3.	93.1
4.	90.9		
Mean	84.8		88.6

均35%)と著しい対比をなしている。

(4) 還元型 glutathione (GSH) 定量

以上より、本症赤血球では著明な易酸化性の亢進が認められることから、赤血球内の sulfhydryl 基の保護作用を有するものとして知られている還元型 glutathione 量の定量を行った。本症赤血球 GSH 量は正常対照と有意の差はなく、良くそのレベルは保たれている (Table 2)。

(5) 赤血球五炭糖磷酸回路活性

本症3症例のうち、検体量の関係上、第1症例に ^{14}C -U-glucose を用い、第2症例および第3症例に ^{14}C -l-glucose を使用して五炭糖磷酸回路活性を検討した。

I. ^{14}C -U-glucose からの $^{14}\text{CO}_2$ 産生能

本症第1症例では正常対照 (第1例および第2例のそれに比べて、basal および stimulated 活性のいずれにおいても有意の差を認めず、その活性は良く維持されている (Table 3)。

この場合、網状赤血球数增多症はみられて

Table 3. The activities of pentose phosphate shunt pathway in acatalasemic red cells.(I) $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -U-glucose ($\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2$ produced/hour/ml RBC)

(A) Basal activity

Normal		Patient	
No. 1	0.130	No. 1	0.107
2	0.101		

(B) Stimulated by 10^{-4} M methylene blue

Normal		Patient	
No. 1	1.400	No. 1	1.630
2	1.437		

(II) $^{14}\text{CO}_2$ production from ^{14}C -l-glucose ($\mu\text{moles } ^{14}\text{CO}_2$ produced/hour/ml RBC)

(A) Basal activity

Normal		Patients	
No. 3	0.133	No. 2	0.114
4	0.123	3	0.141

(B) Stimulated by 10^{-4} M methylene blue

Normal		Patients	
No. 3	1.601	No. 2	1.273
4	1.497	3	1.512

いないことから、TCA cycle による $^{14}\text{CO}_2$ 産生はほとんど無視しうるものと考えられ、得られた $^{14}\text{CO}_2$ 産生に関する成績はほぼ五炭糖回路によるものと考えてよからう。

II. ^{14}C -l-glucose からの $^{14}\text{CO}_2$ 産生能

本症第2症例および第3症例における $^{14}\text{CO}_2$ 産生能は、これも basal, stimulated 活性ともに、正常対照 (第3例および第4例) のそれと比べて有意の差を認めず、正常と考えられる。

(6) 赤血球解糖能

本症患者3症例における解糖能の成績は Table 4 に示した。

これら症例のうち、第1症例では正常対照 (第1例、第2例) と共に本学において採血され、直ちに検索に使用されたものであるが、その glucose 消費能, lactate 産生能, pyruvate 産生能, 赤血球 2, 3-diphosphoglycerate 濃度

Table 4. Glycolytic activities in red cells of patients with acatalasemia.

1) Glucose consumption (μ moles/hour/ml RBC)			
Normal		Patients	
1	2.49	1	2.78
2	1.82	2	1.71
3	1.67	3	2.01
Mean	1.99		2.17
II) Lactate production (μ moles/hour/ml RBC)			
Normal		Patients	
1	2.24	1	2.50
2	2.59	2	1.85
3	2.54	3	1.88
4	2.29	4	—
Mean	2.42		2.08
III) Pyruvate production (μ moles/hour/ml RBC)			
Normal		Patients	
1	0.224	1	0.208
2	0.185	2	0.530
3	0.210	3	0.410
Mean	0.206		0.383
IV) Concentration of red cell 2,3 DPG (mM)			
Normal		Patients	
1	5.06	1	5.56
2	4.92	2	2.68
3	6.53	3	—
4	4.64	4	—
Mean	5.29		4.15

はいずれも正常であった。一方、本症の第2症例および第3症例は秋田県において、正常対照(第3例、第4例)と共に採血、輸送後、すなわち採血2日後に、本学において測定に供されている。そのため、Table 4 にみるごとく、これら第2症例および第3症例では、lactate産生能の低下および pyruvate 貯溜を認めており、NAD/NADH 比の異常を認め、赤血球 2, 3-DPG 量の減少(第2症例)と共に、これらの解糖能の低下は輸送による影響を考えさせ

る。しかし、第1症例の成績と考え合わせると、これらの影響があってもなお、解糖能そのものには、一般的にみて、それほど大きな障害は存在しないものと考えられる。

考 按

以上、本症患者3症例につき、赤血球代謝を検討した。本症の3症例では、いずれも著明な Heinz 小体生成の異常に加えて、ascorbate test における hemoglobin 変性の亢進を認めた。また、その成因としては、hemoglobin 組成は正常であり、赤血球還元能としての五炭糖燐酸回路活性は正常で、赤血球還元型 glutathione 量にも異常を認めなかったことから、この catalase 活性の欠乏そのものによるものと推定される。Jacob らもまた、Aebi らのスイス家系の本症を検索し、oxidative hemolysis の可能性を示唆している。²⁴⁾

以上の *in vitro* 成績より、catalase 欠乏症患者赤血球は、特にその hemoglobin において易酸化性が著しく亢進していることが理解しうる。臨床的に *in vivo* 溶血をみるか否かについては、これらの代謝異常症を有する赤血球にどの程度の酸化作用が負荷されるかにかかっているものと推定される。したがって、感染、月経、妊娠、薬剤(特に酸化剤)の服用などにより代謝的に負荷状態におかれると、catalase 活性をほとんど保有しない本症患者赤血球では、その崩壊に至り、臨床的に貧血、methemoglobin 生成をみるものと考えられる。これら患者に薬剤を投与する際には、上記の成績を十分考慮する必要がある、これら赤血球溶血を惹起しうる諸因子より患者を守ることもまた必要であろう。

文 献

- 1) 三輪史朗：遺伝性溶血性貧血. 日内会誌 73 : 1269—1284, 1984
- 2) Beutler, E.: Hemolytic anemia in disorders of red cell metabolism. New York, Plenum Press. 1978, pp. 1—266
- 3) Proceedings of a U. S. -Japan Cooperative Science Program: Red cell enzymes and abnormalities. Hemoglobin 4 : 575—844, 1980
- 4) Kitamura, M., Iijima, N., Hashimoto, F. and Hiratsuka, K.: Hereditary deficiency of subunit H of lactate dehydrogenase. Clin. Chim. Acta 34 : 419—423, 1971
- 5) Miwa, S., Nishina, T., Kakehashi, Y., Kitamura, M., Hiratsuka, A. and Shizume, K.: Studies on erythrocyte metabolism in a case with hereditary deficiency of H-subunit of lactate dehydrogenase. Acta Haematol. Jpn. 34 : 228—232, 1971
- 6) Scott, E. M. and Griffith, I. V.: The enzymatic defect of hereditary methemoglobinemia; diaphorase. Biochim. Biophys. Acta 34 : 584—586, 1959
- 7) Takahara, S. and Miyamoto, H.: Three cases of progressive oral gangrene due to lack of catalase in the blood (in Japanese). J. Otorhinolaryngol. Soc. Jpn. 51 : 163—164, 1948
- 8) Takahara, S.: Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood (acatalasemia). Lancet 2 : 1101—1104, 1952
- 9) Takahara, S.: Acatalasemia in Japan. In Hereditary disorders of erythrocyte metabolism, ed. by Beutler, E. New York, Grune and Stratton. 1968, pp. 21—40
- 10) Aebi, H. and Suter, H.: Catalase. In Biochemical methods in red cell genetics, ed. by J. Yunis. New York, Academic Press. 1969, pp. 255—288
- 11) 八幡義人：赤血球の代謝. 中尾喜久編：現代血液学. 基礎と臨床. 東京, 中山書店. 1972, pp. 117—158
- 12) 国分 統：諸種耳鼻咽喉科領域疾患及び無カタラーゼ血液症におけるハインツ小体の臨床的並びに実験的研究. 岡山医会誌 71 : 2755—2768, 1959
- 13) Aebi, H., Bossi, E., Cantz, M., Matsubara, S. and Suter, H.: Acatalasemia in Switzerland. In Hereditary disorders of erythrocyte metabolism, ed. by Beutler, E. New York, Grune and Stratton. 1968, pp. 41—61
- 14) Yawata, Y. and Tanaka, K. R.: Red cell glutathione reductase: Mechanism of action of inhibitors. Biochim. Biophys. Acta 321 : 72—83, 1973
- 15) Jacob, H. S. and Jandl, J. H.: A simple visual screening test for glucose-6-phosphate dehydrogenase employing ascorbate and cyanide. New Engl. J. Med. 274 : 1162—1167, 1966
- 16) Yawata, Y. and Jacob, H. S.: Abnormal red cell metabolism in patients with chronic uremia: Nature of the defect and its persistence despite adequate hemodialysis. Blood 45 : 231—239, 1975
- 17) Jandl, J. H., Engle, L. K. and Allen, D. W.: Oxidative hemolysis and precipitation of hemoglobin. I. Heinz body anemias as an acceleration of red cell aging. J. clin. Invest. 38 : 1818—1836, 1960
- 18) Beutler, E., Duron, O. and Kelly, B. M.: Improved method for the determination of blood glutathione. J. Lab. clin. Med. 61 : 882—890, 1963
- 19) Jacob, H. S. and Jandl, J. H.: Effects of sulfhydryl inhibition on red blood cells. III. Glutathione in the regulation of the hexose monophosphate pathway. J. biol. Chem. 241 : 4243—4250, 1966
- 20) Raabo, E. and Terkildsen, T. C.: On the enzymatic determination of blood glucose. Scand. J. clin. Lab. Invest. 12 : 402—407, 1960

- 21) Minakami, S., Suzuki, C., Saito, T. and Yoshikawa, H.: Studies on erythrocyte glycolysis. I. Determination of the glycolytic intermediates in human erythrocytes. *J. Biochem.* 58 : 543—550, 1965
- 22) Marback, E. P. and Weil, M. H.: Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. *Clin. Chem.* 13 : 314—325, 1967
- 23) Keitt, A. S.: Reduced nicotinamide adenine dinucleotide-linked analysis of 2, 3-diphosphoglyceric acid: Spectrophotometric and fluorometric procedures. *J. Lab. clin. Med.* 77 : 470—475, 1971
- 24) Jacob, H. S., Ingbar, S. H. and Jandl, J. H.: Oxidative hemolysis and erythrocyte metabolism in hereditary acatalasemia. *J. clin. Invest.* 44 : 1187—1199, 1965