

人血色素の酸素平衡曲線測定法の改良, 殊にグルコースオキシダーゼを用いた新しい 脱酸素酵素系の導入について

川崎医科大学 生化学Ⅲ教室

井内岩夫・日高和夫・島崎俊一

(昭和59年9月6日受理)

Some improvements on the method for
oxygen equilibrium curve of human hemoglobin with special emphasis
on our newly devised glucose-oxidase deoxygenation enzyme system.

Iwao IUCHI, Kazuo HIDAKA and Shunichi SHIMASAKI

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School

Kurashiki 701-01, Japan

(Received on Sept. 6, 1984)

要 旨

血色素 (Hb) の酸素平衡曲線 (O. E. C.) の測定はその生理機能をうかがう物差しとして最も大切な測定項目の1つである。私共は今回、嘗て報告した酸素電極と光電分光光度計とを組合せた装置に改良を加え、さらに新しく案出した酸素消費のための酸素系 (グルコース — グルコースオキシターゼ — カタラーゼ — アスコルビン酸系) を組込んだ高精度の方法を確立した。即ち、本法により試料液中の Oxy Hb は20分以内に met Hb の生成および変性が絶無の Deoxy Hb に変化させることが出来、再現性の高い O. E. C. を得る事が出来た。本法の吟味成績、Hb のパラメーターの正常値および本法が酸素親和性に異常を有する異常血色素例に支障なく適用し得る事を報告した。

Abstract

For oxygen equilibrium curve (OEC) measurement of hemoglobin (Hb), we were previously reported about our self-made apparatus composed of an oxygen electrode and a spectrophotometer. This paper describes additive devices of an optical cell and the introduction of a new oxygen consumption enzyme system (glucose-glucose oxidase-catalase-ascorbic acid) for the rapid and complete deoxygenation of oxyhemoglobin which gave no methemoglobin formation during examination.

To 1.6ml of the dialysed 15 μ M-Hb against 0.05M bis-Tris, 0.1M NaCl, 0.2M glucose 20 μ l, 10 times diluted catalase (Sigma) 15 μ l, 0.1M ascorbic acid 5 μ l were added in order described and finally start the measurement by adding 5 μ l of 15mg/ml glucose oxidase.

The methodological data and the parameters for OEC were reported.

はじめに

血色素 (Hb) の最も大切な生理的役割は、肺から組織へ酸素を運搬する事にある。ところが遺伝子突然変異の結果、惹起された異常血色素 (abn Hb) のなかには、酸素親和性が正常 Hb にくらべ著しく亢進し事実上酸素運搬機能が無効である例もある。私共は abn Hb のこうした機能を測定するために、嘗つて装置を自作し、微量の試料量で測定出来る方法を確立し公表した¹⁾。

私共は i)その後更に装置に改良を加え、ii)新しい創案になる脱酸素酵素系を測定に組込むことにより、従前法にも増して高および低酸素親和性の abn Hb はもちろんの事、不安定性を伴った高酸素親和性 Hb についても、それを変性させる事なく短時間のうちに測定を完了する方法を確立した。以下にその方法と成績を報告する事にしたい。

方 法

1. 装置

改良の主たる部分である恒温セルを図1に示す。Hb 試料液を入れるセルの内壁には、磁性攪拌子および pO_2 電極がとりつけられ、セルの蓋には加湿 N_2 を液面に吹きつけるガス導入口がある。光路にあたる石英ガラス窓以外はすべてテフロン加工であり、このブロック内を恒温水が循環するようになっている。

2. 試料液

2,3-ジホスホグリセリン酸 (2,3 -DPG) 除去溶血液および電気泳動法もしくはクロマト法により分離精製した Hb 溶液を用いたが、これら試料液の調製は前報¹⁾の方法に準じ15 μ MHb 溶液とした。

3. 試薬

1) 0.05Mピストリス-0.1M NaCl 緩衝液 (pH 6.6~7.8, 25°C)

調製法は前法¹⁾に準ずる。保存期間は4°Cで1ヶ月である。

2) 2,3-DPG 溶液

調製法は前法¹⁾に準ずる。0°C以下に保存すれば数ヶ月間使用しうる。

3) 0.2Mグルコース水溶液

4) 0.1Mアスコルビン酸 (Asc.A.) 水溶液 ℓ -アスコルビン酸 (半井化学) を用いる。指定濃度液を調製する。

5) カタラーゼ (Sigma, Bovine Liver) を試薬1) (pH=7.0) で10倍に希釈し4°C, 12000rpmで40分遠沈し、その上澄液 (緑褐色透明) を用いる。4°C保存で1週間使用しうる。

6) 15mg/mlグルコースオキシダーゼ (G.O.) 溶液

G.O. (Sigma Type IX) 15.0mgをpH=7.0の試薬1)に溶解し、12000rpm (4°C) で40分遠沈しその上澄液 (黄色) を用いる。4°C保存で4~5日有効。

4. 操作

装置を測定準備状態にし、恒温セルに15 μ M Hb (Oxy Hb型) 1.6mlを入れ攪拌を開始する。次いで試薬として、i) グルコース20 μ l, ii) カタラーゼ15 μ l, iii) アスコルビン酸5 μ lを順に加え、25℃の恒温になるのを待つ(5~10分)。時間がきたらグルコースオキシダーゼ(G.O.)を5 μ l加えて蓋をし、窒素ガスを液の表面にゆるやかに吹きつけ測定を開始し、被検溶液のガス分圧(pO_2)の変化および波長576 nmの吸光度(O.D.)変化をXYレコーダーに記録し酸素平衡曲線を描く。具体的には、XYレコーダー上に於けるOxyおよびDeoxy Hbの理論的ペン位置点を、あらかじめ同じOxy Hb型試料液に微量のヒドロサルファイトを加えない場合(Oxy型)と加えた場合(Deoxy型)の pO_2 およびO.D.の座標点AおよびBを記録紙に打点しておき、平衡曲線はA点よりB点に到達したとき終了するようにする。

Bohr効果を求めるときにはpH 6.8, 7.0, 7.2, 7.4および7.8の各Hb溶液を用い、2, 3-DPG効果を測定するときはpH 7.4のHb溶液に2, 3-DPGをHb濃度に対し0, 2, 4, 10, 20, 40, 60および100倍の濃度になるように加えたものについて上述の操作を行なう。

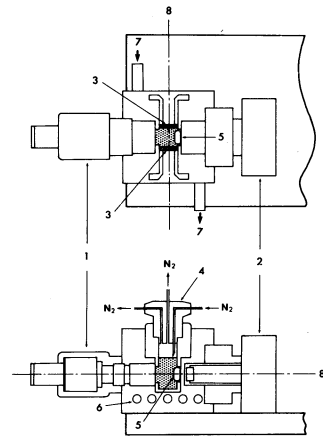


図1. 恒温セルの構造

- | | |
|------------|----------|
| 1. 酸素電極 | 5. 攪拌子 |
| 2. 攪拌用モーター | 6. 循環水通路 |
| 3. 石英ガラス窓 | 7. 水の出入口 |
| 4. 蓋 | 8. 光路 |

成 績

私共が創案した本法による酸素平衡曲線の測定原理は次の如くである。

1. $\text{グルコース} + \text{溶存} O_2 \xrightarrow{\text{G.O.}} \text{グルコノラクトン} + \text{H}_2\text{O}_2$
2. $\text{H}_2\text{O}_2 + \text{Asc.A. (還元型)} \xrightarrow{\text{カタラーゼ}} 2 \text{H}_2\text{O} + \text{Asc.A. (酸化型)}$
3. $\text{Oxy Hb} \longrightarrow \text{Deoxy Hb}$

従って本法を確立する条件は平衡曲線観測の所要時間と反応の中間生成物である過酸化水素が、Hbを酸化してmet Hbとしたり、もしくは H_2O_2 -met Hb複合体を生成したりするのを抑制する事にある。この点に着目しOxy HbのDeoxy化を吟味すると表1の如くなった。

即ち、15 μ M Hb溶液1.6ml中に溶存もしくは結合する酸素に対し、大過剰のグルコース液(20 μ l)を加え、G.O.溶液を加えると、G.O.の増大につれmet Hbの生成が減少し、所要時間も短くなる事がわかった。しかし所要時間を短くしすぎると酸素電極の応答が酸素分圧の減少に追従出来ない。また平衡曲線のきれいなS字性が得られず、値のバラツキも大きかったのでG.O.量として5 μ lを採用した。表から明らかな如く、カタラーゼ量はmet Hb生成が最も

表1 試薬の至適添加量 (pH 7.0)

Oxy Hb (ml)	glucose (μ l)	G. O. (μ l)	catalase (μ l)	Asc. Acid (μ l)	met Hb (%)	Time (min)
1.60	20	1		(%)	75.2	80
〃	〃	3			62.9	60
〃	〃	5			54.6	30
〃	〃	7			56.6	20
〃	〃	10			43.0	15
〃	〃	20			28.1	10
〃	〃	5	5		15.2	30
〃	〃	5	10		10.3	25
〃	〃	5	15		3.3	20
〃	〃	5	20		4.3	20
〃	〃	5	25		5.0	20
〃	〃	〃	15	1	1.9	20
〃	〃	〃	15	3	0.6	20
〃	〃	〃	15	5	0.0	20
〃	〃	〃	15	10	0.0	20

少ない15 μ l に、同様に Asc.A. は 5 μ l と決定した。そして最終的に操作で述べた如く met Hb の生成が皆無の、所要時間20分で完了する方法を確立した。この表1の吟味条件はpH=7.0について得られたものであるが、pH=6.8~7.6のHb溶液についても同様に良好なDeoxy化が進行し met Hb の生成も無く、所要時間15~25分で完了した。

そして観測した平衡曲線をもとに得られる Hill の定数 n, Hbの酸素半飽和時の酸素分圧 (P_{50} もしくは $\log P_{50}$), Bohr 効果 ($\Delta \log P_{50} / \Delta \text{pH}$) の諸数値は従来の報告値¹⁾ とよく一致していた。同様に Hb 溶液の pH=7.4に於ける 2,3 -DPG 効果, IHP効果 (成績省略) も従来法の結果とよく一致していた (図2)。

本酵素系を確立するに当り生成 H_2O_2 のプロトン受容体の選定が最も大切であったが、これについてアルコール類やチオール類²⁾ を種々に吟味したすえ、測定系の濁り防止や還元電位等の面から Asc.A. が最もすぐれた性質をしめす事を知った。また試薬G.O.とカタラーゼはともにヘム化合物であり、それぞれ黄色と緑褐色の溶液であるが今回の使用量では波長500nm以上では吸収は事実上認められず測定に全く支障がなかった。そして測定終了後のHb溶液の吸収スペクトル (可視域) は Deoxy Hb のそれによく一致していた。

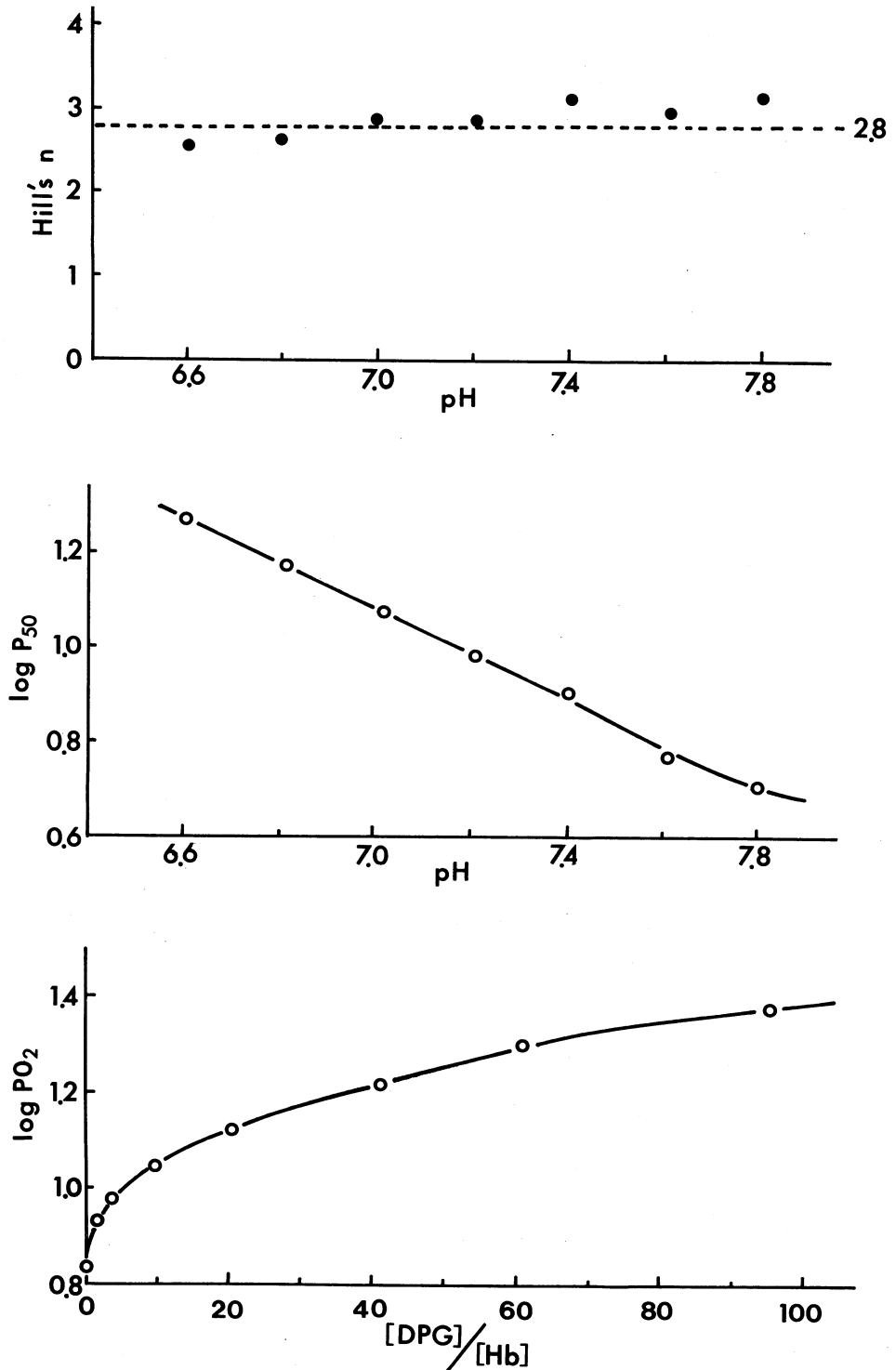


図2. 酸素平衡曲線の諸数値

上から順に Hill の定数 n , Bohr 効果, 2, 3-DPG 効果をしめす。

考 察

酸素平衡曲線の検査法は原理的にいくつかの方法があり、現在は本法の如き自記式の Polarimetric-Spectroscopic 法が最も信頼性が高い³⁾。そしてこの原理に基き私共と同様に酵素系 G6PD と ferredoxin—NADP reductase を導入した林ら⁴⁾の方法があるが、系の構成が複雑であり試薬の保存性もよくない。

私共の本法の特徴は、i) 安価で入取し易い試薬を用い、しかもそれらは安定している。ii) 操作が簡単で容易に実施出来、iii) 測定時間が短い。iv) 完全な Deoxy 化 ($pO_2=0.0$ mmHg) が進行することである。そしてここ数年来遭遇した高いもしくは低い酸素親和性の abn Hb についても極めて高い正確さと再現性をもって測定して来ている。

結 論

私共はさきに酸素電極と光電分光光度計とを組合せた Hb の酸素平衡曲線測定装置の主要部分に改良を加え、更に私共が創案したグルコースオキシダーゼ—カタラーゼ—アスコルビン酸の系を導入し、met Hb 生成が皆無で迅速に Deoxy 化が進行する精度の高い新しい方法を確立した。即ち 0.05M—ピストリス—0.1M NaCl 緩衝液にむかって透析して得た $15 \mu\text{M}$ Hb 溶液 1.6ml に 0.2M グルコース $20 \mu\text{l}$ 、10 倍希釈カタラーゼ (Sigma) $15 \mu\text{l}$ 、0.1M アスコルビン酸 $5 \mu\text{l}$ を順に加え、最後に 15mg/ml グルコースオキシダーゼ $5 \mu\text{l}$ を加え測定を開始する方法である。この方法の確立過程の吟味成績および平衡曲線のパラメーターの諸数値を示した。

文 献

1. 青葉宏子, 井内岩夫, 日高和夫, 島崎俊一
: 異常血色素に関する研究Ⅳ: ヘモグロビンの機能, 特に酸素平衡曲線の測定について
Kawasaki Med. J. Liberal Arts & Sci Course. No 4, 39-47, 1978
2. Batzu, O.: Spectrophotometric assay of oxygen consumption. In methods in Enzymology vol L IV, pp 485-498, Acad Press Inc., 1973
3. Antonini, E and Brunori, M.: Hemoglobin and Myoglobin in their reactions with ligands.
North-Holland Pub. Co., 1971
4. Hayashi, A., Suzuki, T. and Shin, M.: An enzymatic reduction system for metmyoglobin and methemoglobin and its application to functional studies of oxygen carriers. Biochem. Biophys. Acta, 310: 309-316, 1973