

ESR 法による血中 metHb の定量法について

川崎医科大学 生化学(Ⅲ)教室

日高和夫・井内岩夫

(平成元年9月30日受理)

Determination of Erythrocyte Methemoglobin by ESR Spectroscopy

Kazuo HIDAKA and Iwao IUCHI

Department of Biochemistry Kawasaki Medical School

Kurashiki, 701-01, Japan

(Received on September 30, 1989)

概 要

ESR による metHb 量の迅速定量法を metHb 血症例の濃度レベルで検討した。血液試料の前処理として PBS (pH = 7.0) で赤血球を洗浄して血漿を除去し、3,500rpm で遠心して得られた洗浄赤血球 (Hb 濃度30~35g/dl) の 300 μ l を -160 $^{\circ}$ C に凍結し、磁場掃引を行い、1,150ガウム (g = 6.0) に於ける metHb のヘム鉄 (Fe^{III}) の吸収を測定した。正常人の metHb 濃度は 0.64 \pm 0.20% (M \pm SD) であった。

Abstract

A simple and rapid method for the determination of concentration of methemoglobin with use of ESR apparatus have been devised by us. An anticoagulated whole blood was washed and centrifuged several times with PBS solution (pH = 7.0) to remove plasma. An aliquot of 300 μ l of the washed red cell layer was placed in cylinder type cell of ESR and freed to -160 $^{\circ}$ C with liquid nitrogen. The absorption intensity by heme iron (Fe^{III}) of methemoglobin was measured at 1,150 gauss (g = 6.0) by changing of the magnetic field and the proportion of methemoglobin was determined after setting up of the calibration curve. Methemoglobin levels of 19 normal subjects were 0.64 \pm 0.20% of the total hemoglobin.

はじめに

血色素 (Hb) はその酸素分圧に応じて酸素と可逆的に結合する性質があり、末梢組織への酸素運搬体として大切な役割を演じている。Hb 自身いつも強力な酸化剤である酸素に曝されているため、たえず酸化型であるメトヘモグロビン (metHb) に変化しているが、これは同時に赤血球内還元酵素系によりデオキシ Hb (Fe^{II}) にかえされ、正常人では met Hb 濃度は総 Hb 量の約 1% 以下の低い値で平衡が保たれている。しかしこの平衡を移動させるような因子

が作用すれば metHb 血症 (methemoglobinemia) が出現するわけである。すなわち, metHb 濃度が10%以上になるとチアノーゼ (特に口唇, 口腔, 頬, 耳, 爪床に著明) が現れ, さらに進むと運動時の呼吸困難, 疲労感, 時には知能発育障害や神経障害を伴うことも報告されている^{1,2,3)}。

私共はチアノーゼの原因の1つとなる metHb 濃度測定法として ESR (Electron Spin Resonance: 電子スピン共鳴) 装置による方法を吟味検討した。その結果, これまでの分光学的方法に比べ, 迅速確実で, しかも微量の全血から metHb 濃度を測定する方法を確立したので, その成績を報告する。

方 法

1. 試料液: 測定には a) 洗浄赤血球を用いるが, b, c, d, も調製して吟味の対象にしたのでここに記す。
 - a) 洗浄赤血球: ヘパリン採血液を赤血球量の4倍量の PBS 溶液で4回洗浄後, 3,500rpm で遠心し, できるだけ上澄を除く。Hb濃度: 30~35g/dl。
 - b) 溶血液: 赤血球を PBS 溶液で洗浄後, 蒸留水と四塩化炭素を用いて調製したものを濃縮する。Hb 濃度: 25~30g/dl。
 - c) metHb 溶液: 溶血液は赤血塩を加え, 完全に酸化後, Sephadex G-25 カラム (1.5×50cm, 溶出液 PBS) でゲル焔過を行い metHb を溶出後濃縮する。Hb 濃度: 25~30g/dl。
 - d) metHb 化赤血球: 洗浄赤血球に等張の NaNO₂ 溶液を加え完全に酸化し, PBS 溶液で6回洗浄し完全に NaNO₂ を除く。Hb濃度: 30~35g/dl。
2. 試 薬
 - a) PBS 溶液: 0.9%NaCl 入り 10mM リン酸緩衝液 (pH = 7.0) 測定時の試料の Hb濃度の調製には全て PBS 溶液を用いる。
 - b) 液体窒素: 純度99.99% 沸点-196℃。中国化成から供給。
3. 装 置: 電子スピン共鳴装置 JES-RE2X 型 日本電子製。
4. 測定方法

円筒型ガラス石英セル (4mm φ × 270mm) に溶血液あるいは洗浄赤血球 300μl を入れ, ESR 装置のキャビティに固定する。液体窒素で徐々にセルの温度を下げ, -160℃一定に保つ。マイクロ波の周波数を 9,150MHz に設定し, 測定磁場 (2,700 ± 2,500 ガウス) の領域を低磁場から掃引し, レコーダーに共鳴スペクトルを描く, 1,150ガウスの位置の波高を読みとると, この波高が metHb (Fe^{III}) の濃度に比例している。
5. metHb% の計算方法: 図5の検量線から 300μl 中の metHb の絶対量を求め, 別に洗浄赤血球の Hb 濃度から 300μl 中の総 Hb 量を計算し, 両者から metHb% を求める。

$$\text{metHb\%} = \frac{\text{検量線から求めた metHb 量}}{300\mu\text{l 中の総 Hb 量}} \times 100$$

成 績

1. 溶血液中 metHb の ESR スペクトルとその直線性：5, 10, 20% の割合で metHb を含む溶血液の ESR スペクトルを図 1 a に示した。

ピークの位置は 1,150 ガウス (g 値：6.0) であった。また metHb とスペクトルのピーク高さの間には良好な直線関係があり検量線は直線をしめすことがわかった (図 1 b)。

2. metHb への測定温度および pH による影響：metHb のピーク高さと測定温度の関係を図 2 a に示した。-70℃ からピークが現われはじめ、温度の降下に従って吸収も増加した。現装置の使用可能な温度 -160℃ で最高の吸収を示した。従って -160℃ を測定温度として採用した。また metHb のピーク高さと測定 pH との関係を図 2 b に示した。アルカリ性の pH (=10) では metHb のピークはまったく現われず、酸性になるにしたがってピークが現われた。私共は Hb の安定性を考慮して測定には pH = 7.0 の緩衝液を用いた。

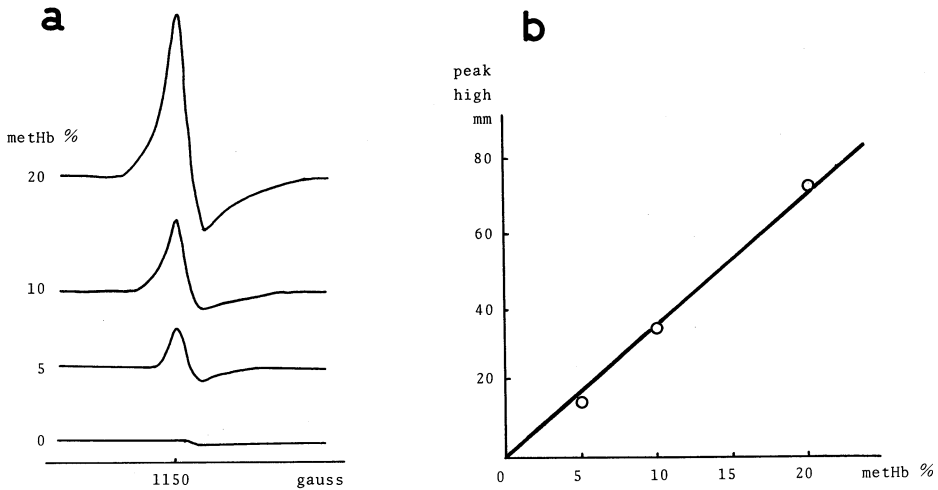


図 1 a : 溶血液中の metHb の ESR スペクトル
b : 各 metHb % とピーク高さの関係

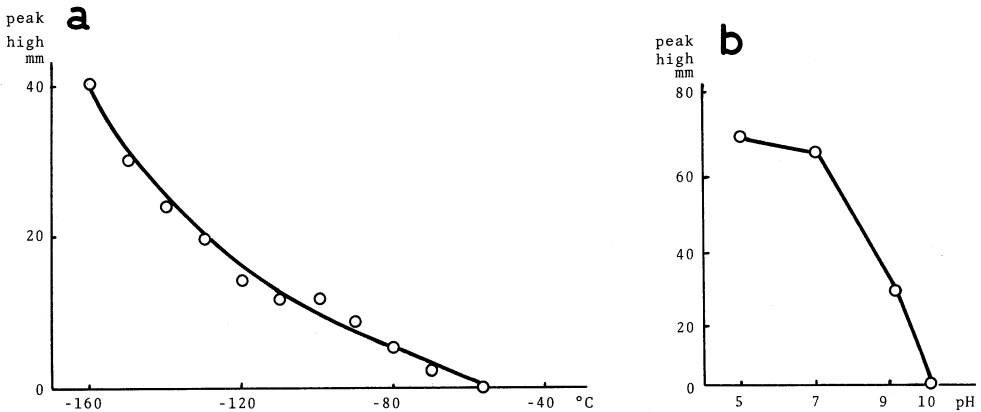


図 2 a : 測定温度と metHb のピーク高さの関係
b : 測定 pH と metHb のピーク高さの関係

3. 洗浄赤血球への血漿の影響：metHb 化赤血球を一定の割合で含む洗浄赤血球に血漿を加えた測定結果を図3に示した。血漿量の増加するにしたがってスペクトルのピーク高さの減少がみられた。この事は Hb の (Fe^{III}) 以外の Fe^{III} 化合物もピーク高さに影響することを意味し、赤血球は十分に洗浄し、血漿を完全に除く必要があった。
4. metHb 測定値への赤血球内 (2 価鉄) Hb の影響：Hb 濃度が 2, 6, 16, 26, 32 g/dl になるように希釈した洗浄赤血球には同一割合に metHb 化赤血球を加えて測定した結果を図4に示した。Hb 濃度の増加とともに metHb のピーク高さが減少したが 26~32 g/dl ではほぼ一定の値を示し、この Hb 濃度領域では metHb のピーク高さに影響を与えないことがわかった。
5. 洗浄赤血球内 metHb の検量線：metHb 量が 200, 400, 600 μg になるように metHb 化赤血球を量り、全容量が 300 μl になるように 32 g/dl の Hb (Fe^{III}) 濃度の洗浄赤血球を加え、その ESR スペクトルを測定した (図5)。metHb とピーク高さには良好な直線性がみられ定量性があることが示された。

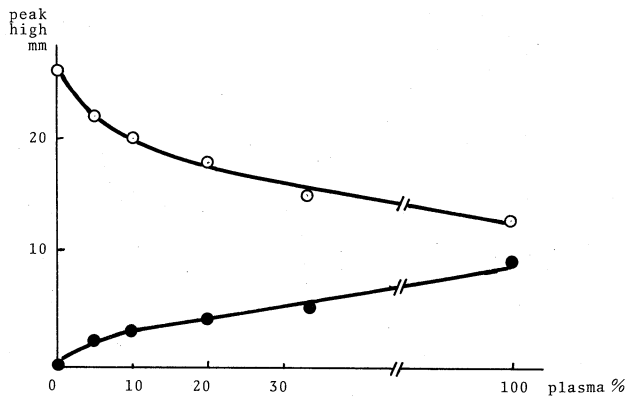


図3 洗浄赤血球内 metHb に対する血漿の影響
○：metHb のピーク高さ
●：non-heme ferric iron 化合物のピーク高さ

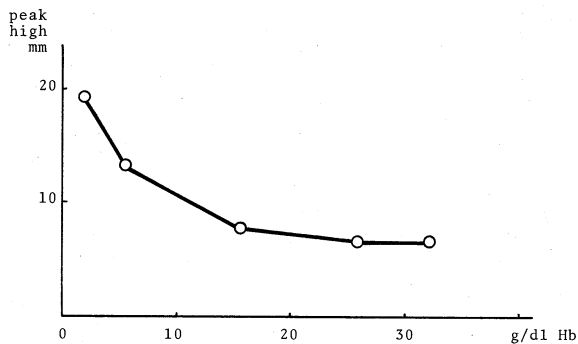


図4 洗浄赤血球内 metHb に対する Hb 濃度の影響

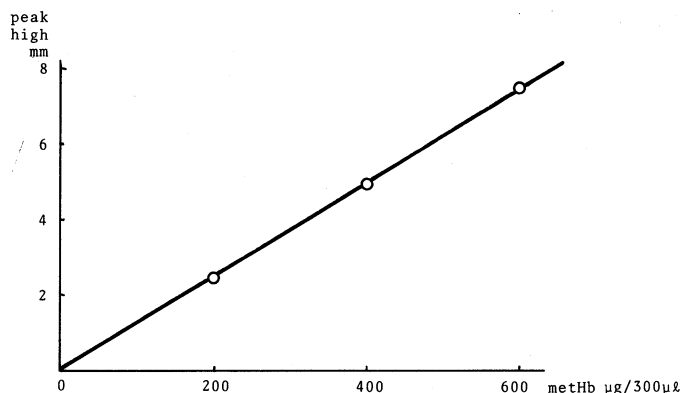


図5 洗浄赤血球内 metHb の検量線

6. 正常人の metHb 量：19例の正常人の洗浄赤血球 300μl の ESR スペクトルを測定し、図5の検量線から計算した metHb は最小0.31%、最高1.10%でその平均値は $0.64 \pm 0.20\%$ (M ± SD) であった。

考 察

metHb の定量法としてこれまで分光学的方法が用いられているが、この測定時の諸条件、例えば溶血方法、測定までの時間、溶血液 pH、温度等によってその値に変動がみられ、条件の規制が繁雑で満足されるべきものではなかった^{4,5)}。

そこで、私共は2価のヘム鉄 (Fe^{II}) を有する主成分のオキシ Hb は検出されないが、3価のヘム鉄 (Fe^{III}) を有する metHb だけが検出可能な ESR 装置を用いて、簡単にしかも迅速に定量できる方法の検討を行なった⁶⁾。metHb のヘム鉄 (Fe^{III}) は電子軌道の d 軌道に5個の奇数個の電子を有し、酸性溶液中では5個の電子は一つずつ5個の d 軌道に入り、 $S = 5/2$ (高スピン) 状態となり、ESR 測定において吸収がみられる (図2 b)。一方アルカリ性溶液中では5個の電子は d 軌道の低い3つの軌道に入り、 $S = 1/2$ (低スピン) 状態となり ESR 測定では吸収がみられない⁷⁾。この事から metHb の定量は pH7.0以下の Hb 分子に損傷を与えない酸性領域で行う必要がある。一般に Fe^{III} 、 Co^{II} 、 Cu^{II} を含む錯体は低温の方が吸収感度が良いといわれている。実際に metHb の場合、 -160°C で最も高い感度を示した (図2 a)。また低温の利点は試料が安定に保たれる点にある (変性や沈殿がありえない)。

試料作製の簡略化のため血球洗浄等の操作を省略した血漿含有赤血球を用いて血漿の影響を調べたが、図3の如く、血漿の増加に伴い metHb の吸収が減少しかわりに $g = 4.2\sim 4.3$ の位置の吸収が増加した。これは non-heme ferric iron 化合物によるものと考えられ、この化合物の増加が metHb の吸収を防げる原因と思われた。この事から赤血球の洗浄は不可欠であった。図4に示した如く、metHb 量を一定にして赤血球内2価鉄型 Hb 濃度を変化させると Hb 濃度が高くなるに従って metHb の吸収が減少したが 26 g/al 以上では吸収に差がなかった。

この事は正常人の metHb 量を測定するには赤血球内 Hb 濃度が 30 g/dl 以上あれば, metHb の濃度測定が正確に行なえる事を示している。また 30 g/dl の Hb 濃度を得るためには洗浄赤血球を 3,500rpm で遠心する必要がある。上記の諸条件を考慮に入れた本法を実施すれば Hb に外的要因を与えることなく短時間で正確に血球内 metHb 量を測定できる事が証明された。

結 論

ESR 装置を用いて metHb 血症における metHb 量の迅速定量法を検討した。試料として PBS 溶液 (pH = 7.0) で洗浄して血漿を除去し, 3,500rpm で遠心した洗浄赤血球層 (Hb : 30~35 g/dl) を用いた。測定は 300 μ l の洗浄赤血球層を -160 $^{\circ}$ C に凍結してマイクロ波周波数 9,150MHz で磁場掃引を行ない, 1,150 Gauss (g 値=6.0) に metHb のヘム鉄 (Fe^{III}) の吸収を得た。その吸収強度から metHb の濃度を計算し, 正常人の metHb は 0.64 \pm 0.20% であった。ESR 法による測定は迅速測定法として適用可能であることを証明した。

文 献

1. Jaffe, E. R., Newman, G., Rothberg, H., Wilson, F. T. and Webster, R. M.: Hereditary methemoglobinemia with and without mental retardation. *Am. J. Med.*, 41 : 42~55, 1966.
2. Leurox, A., Junien, C., Kaplan, J. C. and Bamberger, J.: Generalised deficiency of cytochrome b₅ reductase in congenital methemoglobinemia with mental retardation. *Nature*, 258 : 619~620, 1975.
3. Ohkuwa, H., Takazakura, E., Terada, Y., Makino, H., Tanishima, K. and Yoneyama, Y.: A familial study of methemoglobinemia. *Nippon Naika Gakkai Zashi*, 75 : 427~430, 1986 (Jpn).
4. Evelyn, K. A. and Malloy, H. T.: Microdetermination of oxyhemoglobin, methemoglobin and sulfhemoglobin in a single sample of blood. *J. Biol. Chem.*, 126 : 655~662, 1983.
5. Mansouri, A.: Methemoglobinemia. *Am. J. Med. Sci.*, 289 : 200~209, 1985.
6. Peisach, J. and Blumberg, W. E.: The specific compounds formed during the reversible and irreversible denaturation of hemoglobin and its constituent chains. In *Genetical, Functional, and Physical Studies of Hemoglobins*, ed. by Arends, T., Bemski, G. and Nagel, R. L., S. Karger. Basel. München. Paris. London. New York. Sydney. pp.199~207. 1971.
7. Wittenberg, J. B.: The Ligand of oxyhemoglobin. *Ibid.* pp.189~198.