

細分課題 6

6 (1) 先天性代謝異常症・分子病の発生予防に関する遺伝生化学的研究

6・1) 酵素異常症赤血球の酸素運搬能とその代償

大阪大学医学部

林 昭

木戸口 公一

鈴木 友和

山村 雄一

研 究 目 的

ある特定の細胞のはたらきは、その細胞を構成するあらゆる成分の間の相互関係から成立っている。したがって、その細胞に関係する疾病の成立にもこれら各成分の相互関係を無視することは不可能である。われわれの体を構成する細胞の中でも、赤血球はその構成成分相互の關係に基づいて解析が可能な数少ない細胞の一つである。

昨年度、われわれは生きた患者血球の酸素運搬能を、微量の血液を用いて迅速に、かつ正確に測定する方法を開発し、これが各種遺伝性酵素異常症および異常ヘモグロビン症の病態の解析に応用しうることを証明した。

そこで本年度は、この方法を用いて赤血球のもつとも重要な働きである酸素運搬能を中心にとり上げ、遺伝性酵素異常症血球の呈する機能異常とその代償機構の解明を目的に以下の研究をおこなった。

研 究 方 法

(1) 試 料

以下の解糖系路上の酵素に異常を有する患者血球を試料とした。すなわち、グルコース・リン酸イソメラーゼ (GPI)、ホスホフルクトキナーゼ (PFK)、ホスホグリセリン酸キナーゼ (PGK)、ジホスホグリセロムターゼ

(DPGM)各1家系, 1例ずつ, およびビルビン酸キナーゼ(PK)5家系, 9例の異常ホモ, および3例のヘテロ(DPGM, 2例およびPK, 1例)よりなる。

#### (2) 赤血球浮遊液の調整

ヘパリン加血液0.1 mlを0.15 M等張リン酸緩衝液, PH 7.4に稀釈し, ヘマトクリット0.3%の稀薄赤血球浮遊液をつくり, これをそのまま試料とする。

#### (3) 装置

今井らにより開発されたヘモグロビン酸素平衡曲線自動記録装置(Bochim. Biophys. Acta, 200, 189-196 (1970))を一部改変して用いた。

#### (4) 操作

前述の稀薄赤血球浮遊液6 mlをセルに入れ, 温度を正確に37°Cに調整した後純酸素ガスを約10分間通気する。セル内の酸素分圧が約700 mmHg前後になった時, 除々に純窒素ガスを通気し始め, 同時におこる酸素分圧の変化と吸光度の変化を, それぞれx-yレコーダーのxおよびy軸に同時に記録せしめる。

(5) 2, 3-dihosphoglyceric acid (DPG)の測定  
水上らの方法に準じて行なった。

### 研究 成 果

#### (1) 酵素異常症血球の酸素平衡曲線の特徴

最も典型的な例としてPK異常症およびPFK異常症患者血球の酸素平衡曲線を, 正常人のそれと比較する。5種類の曲線は, いずれもきれいなS字形を示し, 完全に同じ形をしているが, それぞれの位置は異なっている。これら酵素異常症患者血球の酸素に対する親和性が正常人( $P_{50} = 2.5.2 \text{ mmHg}$ )と異なることを示すもので, PK異常症では親和性が低く( $P_{50} = 3.2.4 \text{ mmHg}$ ), PFK異常症では高く( $P_{50} = 1.8.8 \text{ mmHg}$ )なっている。

このように, 酵素異常症赤血球の酸素平衡曲線は, 異常ヘモグロビン症の場合とは対照的に, それぞれ酸素親和性は異なるが, 曲線の形は完全に正常人血球と同じである。

(2) 酵素異常症血球における酸素親和性( $P_{50}$ )と, 解糖中間体, とくに

## DPGとの関係について

ヘモグロビンと酵素系は、赤血球という細胞内に同居しているから、酵素系に異常がおくとヘモグロビンにも影響が現われる。そこで、これら酵素異常症血球について、各種解糖中間体と酸素親和性との関係について調べてみたところ、各種解糖中間体のうち、DPGのみが赤血球酸素親和性と密接な関係のあることが明らかになった。すなわち、図1に示すごとく、P50の値の小さなPFK、DPGM異常症ではDPG量は少なく、逆にP50の大きなPK、PGK異常症ではDPG量も多いという関係にあり、この両者の間の相関はほぼ完全である( $r = 0.91$ ,  $P < 0.001$ )。DPGはすでにBenesch, Chanutinらにより明らかにされているごとく、赤血球内にあってヘモグロビンの酸素に対する親和性を生理的な値に維持するのに大きな役割を果している重要な物質である。そこで、これら異常酵素を解糖系の上で眺めてみると、PFKおよびPKは、DPG副経路をはさんでそれぞれ上位および下位の律速酵素であり、また、DPGMはDPG副経路上にあってDPGの生成を直接支配し、PGKはその主経路上の酵素である。したがって、これらの酵素は、解糖系上において、とくにDPGの生成に関してそれぞれはつきりした役割をもち、その結果がこれら酵素異常症血球の酸素親和性にも反映されたものと考えられる。

また一方、GPI異常症血球は、酸素親和性、およびDPGともに略々正常範囲内にあるが、これはGPIがDPG経路よりも上位にあり、5炭糖系を介する副経路の存在によりDPG生成には影響が現われず、その異常は酸素親和性の変化としてはみられない。

## (3) 酵素異常症血球の酸素親和性(P50)と血球容積(PCV)との関係について

赤血球の酸素平衡曲線について、動脈血の酸素分圧を100 mmHg、静脈血のそれを40 mmHgとして、この曲線から末梢組織へ送られる酸素の量を計算すると、正常人血球の22%に対してPFKでは10.7%と減少し、PKでは逆に29.5%と増加している。このような末梢組織への酸素供給の変動に対応して生体の恒常状態を維持するためのメカニズムは、如何なるものであろうか？

各酵素異常症につき、縦軸にPCV、すなわちヘマトクリット値を、横軸にP50値をとると、図2に示すごとく、この両者の間にはきれいな負の相関関係が得られる( $r = -0.82$ ,  $P < 0.001$ )。ここに示す酵素異常症の大部分は、溶血性貧血があるにもかかわらず、一応完全に代償された状態にあると考えられており、その個体に必要な最低量の酸素の供給は行なわれている。しかるに、血液学的には、P50の大きなPK, PGKではPCVは小さく、明らかに貧血の状態にあり、逆にP50の小さなPFK, DPGMではPCVは大きく、みかけ上貧血はない。これは骨髄による調節機構に由来するもので、生体に必要な酸素の供給状態を明確に反映するものである。したがって、血液学的な意味での貧血は、その個体の酸素の供給状態を考慮した上で再検討されなければならない。しかし、この図において、分布からはずれた4点(矢印)は、いずれも摘脾前のPK異常症血球であるが、このうち矢印1は、摘脾後矢印1'に移り、明らかに分布群に属するようになる。この事実から分布群からはずれ、とくに左下へのはずれは、非代償性状態を意味するものと考えられ、その個体の予後を占う上にも役立つ。

#### (4) 赤血球PKの遺伝的変異が酸素親和性およびDPG値におよぼす影響について

症例数の多いPK異常症について、各家系単位にその血液学的所見、DPGおよびP50値を比較して表1に示す。表からも明らかなように、各家系間でこれらの数値を比較すると、4家系ともいずれも独特の数値を示す。ところが同一の家系に属する患者の間ではこれらの数値は非常に似た値を示している。これら各家系について、PKタンパクはその物理化学的性質を異にすることが三輪らにより証明されているから、上述の成績はPKタンパクの遺伝的異質性が、赤血球の酸素運搬能を含む臨床症状にまでおよぶことを意味する。

#### (5) PK異常症に対する摘脾の効果について

現在のところ、PK異常症に対する治療法としては、摘脾が唯一のものであり、しかもその効果については、必ずしも評価は一定していない。その理由の一つとして、効果の判定基準に問題があるのではないかと考えられる。

表2にPK<sub>Osaka</sub>症例につき、血液学的所見、酸素親和性、DPG値などを摘脾の前後で比較して示す。まず、すでに摘脾の終っている姉M.T.は、血

液学的には明らかに貧血の状態（赤血球数  $232 \times 10^4$  ,ヘモグロビン値  $7.6 \text{ g/dl}$  ,ヘマトクリット  $27.9\%$ ）にあるが、DPG値、P50値はいずれも大きく、輸血は必要なく、一応代償状態にあると考えられる。一方、妹C.T.は、摘脾を行なう前に2回に亘り調べられているが、同一家系に属するにも拘わらず、姉と比較して貧血の程度も強く、DPG値、P50値も小さく、しかも頻回の輸血を必要としていた。その後、この妹の摘脾を行なったところ貧血の程度にさほど変化はみられないが、網状赤血球の著しい増加と共にDPG値、P50値ともに増加し、分体として姉の成績に近くなり、しかも輸血を全く必要としない状態にまで回復した。これは、摘脾の結果、ATPおよびDPG含量の多い網状赤血球の著しい増加をきたし、赤血球そのものの安定化とともに末梢組織への酸素供給を増加するためと考えられる。

#### 考 察

赤血球を構成するもつとも重要な成分は、赤血球膜、エネルギー代謝系、およびヘモグロビンである。とくにヘモグロビンは、赤血球のタンパク成分の95%以上を占め、赤血球自身の酸素運搬機能と直結している。これら各赤血球構成成分は、相互に密接なつながりを持ち、その中心的存在であるヘモグロビンの酸素運搬機能を最大限に発揮しうるような環境をつくり上げていると考えられる。

赤血球は肺で酸素と結合し、これを末梢組織へ運んで呼吸という重要な機能を営んでいる。この過程には、ヘモグロビン分子自身の明らかな立体構造の変化を伴っている。この変化ともつとも密接につながるのは解糖系で、とくにEmbden - Meyerhof系上の赤血球に特異的な中間代謝物であるDPGはデオキシ型ヘモグロビンとのみ特異的に結合してその酸素親和性を低下し、必要に応じて増減することにより赤血球の酸素運搬作用を調節しているといわれる。事実高地へ登ったときの順応過程、各種貧血症、各種心不全などにおいて、いずれもDPGの量は目的にかなった動きを示している。

酵素異常症において、酸素親和性と、DPG量との間には、きわめて明瞭な相関関係が認められるが、この場合は上述の各種貧血症などとは異なり、適応というよりはむしろその酵素的解糖系におけるDPG産生の役割を反映すると

いう方が妥当である。したがって、酵素異常症における赤血球機能の真の調節代償機構は、酸素親和性とPCVとの関係にみられるごとく骨髓により営まれるもので、正常人を含めてあらゆる疾患に共通するものであろうと考えられる。

## 要 約

各種酵素異常症につき、その赤血球機能をD.P.G.、その他各種血液学的パラメーターとの関係を調べた。その結果、赤血球の酸素親和性は、各酵素の解糖系におけるD.P.G.産生の役割、あるいは、同一酵素(P.K.)においてはその遺伝的異質性を反映して増減し、これを調節代償する機構は骨髓により行なわれることを明らかにし、同時に治療法としての摘脾の意義を論じた。

## 発 表 論 文

- 1) 林 昭, 鈴木友和, 木戸口公一, 三輪史朗(1974) 赤血球機能異常とその代償機構—特に先天性酵素異常症および異常ヘモグロビン症をモデルとして— 臨床化学シンポジウム, 14巻, 17~20。
- 2) その他3編を準備中。

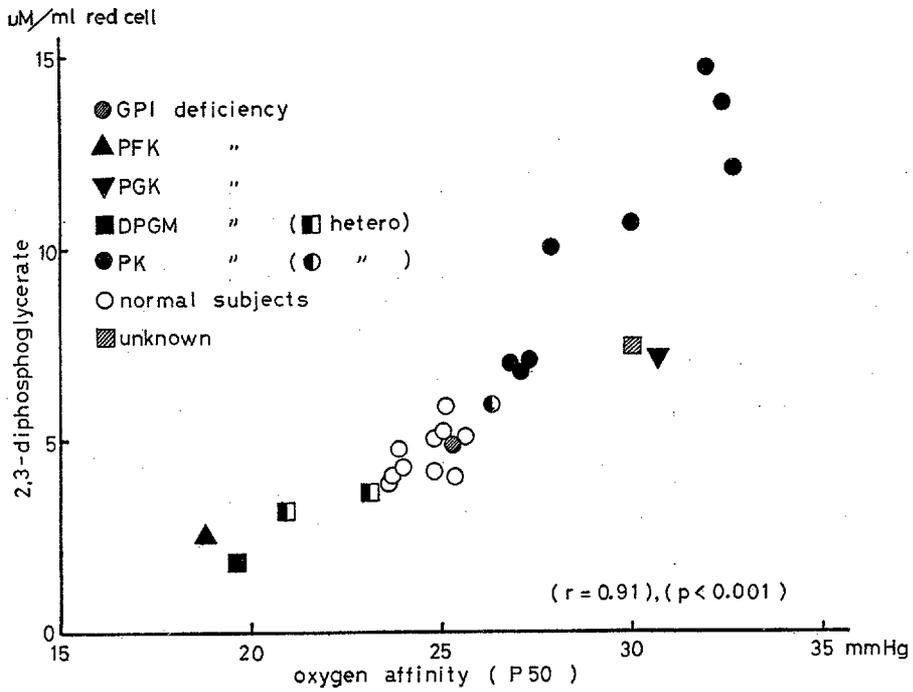


図1 酵素異常症血球における酸素親和性 ( p 50 ) と D P G との関係について

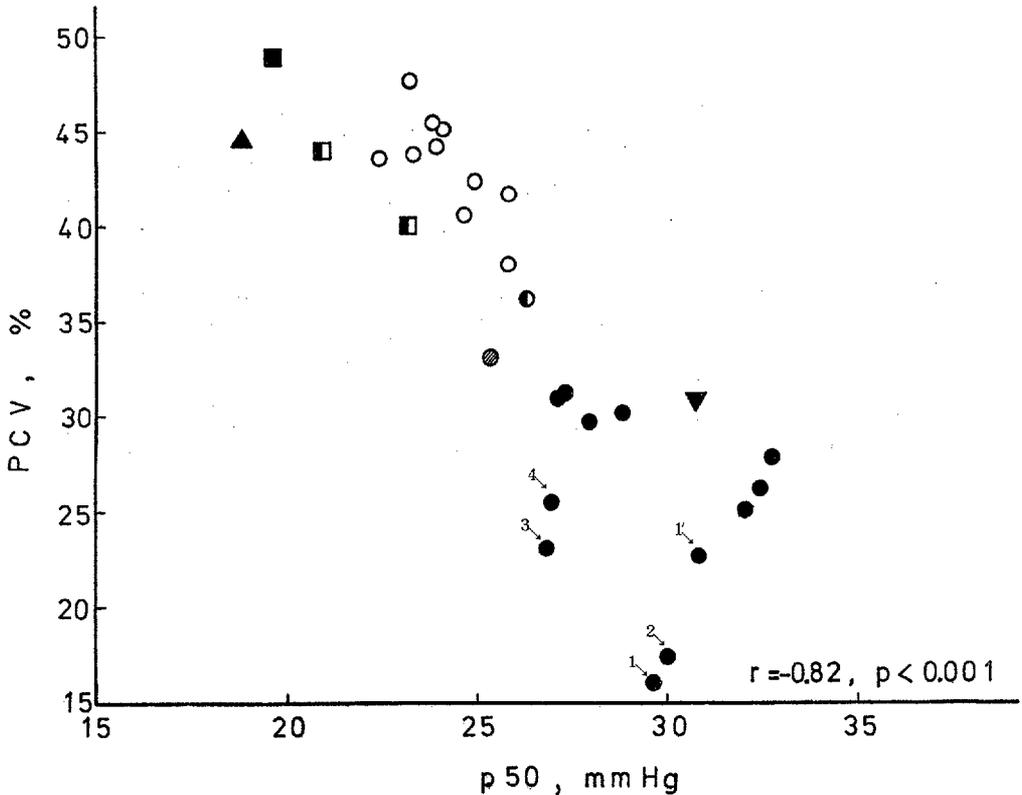


図2 酵素異常症血球の酸素親和性 ( p 50 ) と血球容積 ( PCV ) との関係について  
●, ●, ▲, ▼, ■, ○, いずれも図1と同じ

表1 PK異常症各家系の血液学的所見, DPG, およびp50値の比較

PATIENT	VARIANT	RBC x10 <sup>4</sup>	Hb g/DL	Ht %	RETICS. %	2,3-DPG μM/ML RBC	p50 MMHg	SPLENECTOMY
Y.K. F.K.	PK <sub>TOKYO I</sub>	246 216	7.9 7.5	26.2 25.1	88.0 95.0	13.7 14.6	32.4 32.0	+ +
M.K. S.S.	PK <sub>TOKYO II</sub>	308 300	11.0 10.9	31.2 31.0	2.6 2.4	7.1 6.8	27.3 27.1	- -
T.S. A.W.		347 315	10.1 9.7	30.2 29.7	4.8 6.4	10.6 10.0	28.8 27.9	- -
M.T. C.T.	PK <sub>OSAKA</sub>	232 178	7.6 6.4	27.9 22.7	80.0 96.0	12.1 13.6	32.7 30.8	+ +

表2 PK Osaka 症に対する摘脾の効果

PATIENT	SPLENECTOMY	RBC x10 <sup>4</sup>	Hb g/DL	Ht %	RETICS. %	2,3-DPG μM/ML RBC	p50 MMHg	BLOOD TRANSFUSION
M.T.	+	232	7.6	27.9	80.0	12.1	32.7	-
C.T.	-	196	7.5	23.1	14.6	7.0	26.8	+
C.T.	-	157	5.6	16.0	15.0	7.5	29.6	+
C.T.	+	178	6.4	22.7	96.0	13.6	30.8	-

↓  
**検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用  
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります  
↓

#### 研究目的

ある特定の細胞のはたらきは、その細胞を構成するあらゆる成分の間の相互関係から成立っている。したがって、その細胞に関係する疾病の成立にもこれら各成分の相互関係を無視することは不可能である。われわれの体を構成する細胞の中でも、赤血球はその構成成分相互の関係に基づいて解析が可能な数少ない細胞の一つである。