

**PROPERTIES OF ACATALASIC CELLS GROWING IN VITRO**

体外培養における無カタラーゼ細胞の特質

ROBERT S. KROOTH, M. D.

R. RODNEY HOWELL, M. D.

HOWARD B. HAMILTON, M. D.



## THE ABCC TECHNICAL REPORT SERIES

### A B C C 業績報告集

The ABCC Technical Reports provide a focal reference for the work of the Atomic Bomb Casualty Commission. They provide the authorized bilingual statements required to meet the needs of both Japanese and American components of the staff, consultants, advisory councils, and affiliated governmental and private organizations. The reports are designed to facilitate discussion of work in progress preparatory to publication, to record the results of studies of limited interest unsuitable for publication, to furnish data of general reference value, and to register the finished work of the Commission. As they are not for bibliographic reference, copies of Technical Reports are numbered and distribution is limited to the staff of the Commission and to allied scientific groups.

この業績報告書は、A B C Cの今後の活動に対して重点的の参考資料を提供しようとするものであって、A B C C職員・顧問・協議会・政府及び民間の関係諸団体等の要求に応ずるための記録である。これは、実施中で未発表の研究の検討に役立たせ、学問的に興味が限定せられていて発表に適しない研究の成果を収録し、或は広く参考になるような資料を提供し、又A B C Cにおいて完成せられた業績を記録するために計画されたものである。論文は文献としての引用を目的とするものではないから、この業績報告書各冊には一連番号を付してA B C C職員及び関係方面にのみ配布する。

## PROPERTIES OF ACATALASIC CELLS GROWING IN VITRO

体外培養における無カタラーゼ細胞の特質

ROBERT S. KROOTH, M.D.<sup>1</sup>

R. RODNEY HOWELL, M.D.<sup>1</sup>

HOWARD B. HAMILTON, M.D.<sup>2</sup>

National Institutes of Health, Bethesda, Maryland,<sup>1</sup>  
and ABCC Department of Clinical Laboratories<sup>2</sup>

米国メリランド州, ベセスダ市の National Institutes of Health<sup>1</sup>  
および ABCC 臨床部<sup>2</sup>



ATOMIC BOMB CASUALTY COMMISSION  
• Hiroshima - Nagasaki, Japan

A Research Agency of the  
U.S. NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES - NATIONAL RESEARCH COUNCIL  
under a grant from  
U.S. ATOMIC ENERGY COMMISSION  
administered in cooperation with the  
JAPANESE NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH of the MINISTRY OF HEALTH & WELFARE

原爆傷害調査委員会  
広島 - 長崎

厚生省国立予防衛生研究所  
と共同運営される  
米国学士院 - 学術会議の在日調査研究機関  
(米国原子力委員会研究費に依る)

## ACKNOWLEDGMENTS

### 感謝の言葉

The authors take pleasure in acknowledging the interest and encouragement of Dr. Harry Eagle, Dr. J.E. Seegmiller, and Dr. L. T. Kurland. We are most grateful to several physicians in Japan who performed the biopsies and helped us in many ways. We should like particularly to acknowledge the assistance and interest of Dr. Teraoka of the Atomic Bomb Casualty Commission staff, Hiroshima.

Dr. Harry Eagle, Dr. J.E. Seegmiller, および Dr. L. T. Kurland から寄せられた御好意と御支援に対し深く感謝する。尚、外科病理を実施し、かつ多くの点で御助力を与えられた医師諸兄に対し深甚なる謝意を表す。特に広島原爆傷害調査委員会の寺岡医師の御好意と御援助にお礼を申し述べたい。

# TABLE OF CONTENTS

## 目次

	<i>Page</i>
<b>List of Tables and Figures</b> 挿入図表一覧表	1
<b>Introduction</b> 緒言	1
<b>Materials and Methods</b> 材料および方法	2
<b>Clinical Data</b> 臨床資料	2
<b>Techniques of Cell Culture</b> 細胞培養方法	3
<b>General Techniques</b> 一般的方法	3
<b>Selection Experiments</b> 淘汰実験	4
<b>Chemical Determinations</b> 化学的定量	5
<b>Results</b> 結果	7
<b>Catalase Assay</b> カタラーゼ測定の特質	7
<b>General Properties of the Assay</b> 検査の一般的特質	7
<b>Role of Extraneous Variables in Determining the Catalase         Activity of a Cell Line</b> 細胞系統のカタラーゼ活性測定における外部の変数の役割	9
<b>Catalase Values</b> 若干の細胞系統におけるカタラーゼ値	10
<b>Mixing Experiments</b> 混合実験	14
<b>Selection Experiments</b> 淘汰実験	15
<b>Discussion</b> 考按	17
<b>Summary</b> 総括	17
<b>References</b> 参考文献	19

# LIST OF TABLES AND FIGURES

## 挿入図表一覧表

Page

Table 表	<p>1. Clinical data for donors of skin biopsies used to establish cell lines 細胞系統を得るために使用した皮膚切片の提供者に関する臨床資料</p> <p>2. Comparison of observed and theoretical catalase activity in mixtures using cell sonicate and crystalline catalase 超音波処理細胞液と結晶カタラーゼを用いた混合液におけるカタラーゼ活性観察値と理論値との比較</p> <p>3. Number of determinations, age, and mean catalase activity for each cell line 各細胞系統の測定数, 年齢および平均カタラーゼ活性</p> <p>4. Summary of mean catalase activity for acatalasemic, hypocatalasemic, and normocatalasemic cell lines 無カタラーゼ, 低カタラーゼおよび正常カタラーゼ細胞系統の平均カタラーゼ活性の総括</p> <p>5. Comparison of lactic acid dehydrogenase and catalase activities in selected cell lines 淘汰した細胞系統における乳酸脱水素酵素とカタラーゼ活性との比較</p> <p>6. Comparison of observed and theoretical Catalase activity in mixtures of acatalasemic and normal cell lines 無カタラーゼ細胞系統と正常細胞系統との混合液におけるカタラーゼ活性の観察値と理論値との比較</p>	<p>2</p> <p>9</p> <p>11</p> <p>12</p> <p>13</p> <p>15</p>
Figure 図	<p>1. Pedigrees of donor ACA, acatalasemic: and donor TAC, hypocatalasemic 低カタラーゼTAC提供者と無カタラーゼACA提供者の家系</p> <p>2. Kinetics of hydrogen peroxide reduction in cellular sonicate solution 超音波処理細胞溶液における過酸化水素還元反応</p> <p>3. Relationship of catalase activity to concentration of protein in ITA cell line ITA細胞系統における蛋白濃度とカタラーゼ活性との関係</p> <p>4. Distribution of catalase activity for normocatalasemic, hypocatalasemic, and acatalasemic cell lines 正常カタラーゼ, 低カタラーゼ, 無カタラーゼ細胞系統における特定のカタラーゼ活性値の頻度</p> <p>5. Catalase activity related to age for BA normocatalasemic and TAC hypocatalasemic cell lines BA正常カタラーゼ細胞系統とTAC低カタラーゼ細胞系統の経過日数とカタラーゼ活性との関係</p> <p>6. Catalase activity for mixtures of cell sonicates of ITA normocatalasemic and ACA acatalasemic cell lines ITA正常カタラーゼ細胞系統とACA無カタラーゼ細胞系統の超音波処理細胞混合液のカタラーゼ活性</p> <p>7. Milligrams of cell protein in CB normocatalasemic and ACA acatalasemic cells following twenty minute exposure to varying concentrations of hydrogen peroxide 各濃度の過酸化水素で20分間処理した後におけるCB正常カタラーゼ細胞とACA無カタラーゼ細胞の細胞蛋白量 (mg)</p>	<p>3</p> <p>8</p> <p>8</p> <p>11</p> <p>12</p> <p>15</p> <p>16</p>
Plate 写真	<p>1. Photomicrograph of a culture of the ACA acatalasemic cell line showing mitosis. Cells are fusiform and transparent. (x150) ACA無カタラーゼ細胞系統培養の顕微鏡写真。有糸分裂を示す。細胞は紡錘状かつ透明である。</p>	<p>4</p>

## PROPERTIES OF ACATALASIC CELLS GROWING IN VITRO

### 体外培養における無カタラーゼ細胞の特質

#### INTRODUCTION

Acatalsia is a rare disease characterized by congenital absence of the enzyme catalase.<sup>1-5</sup> Over 50 cases are at present known. All of these cases have occurred in Japan -- in Japanese persons and in one Korean family; about half of the patients are symptom-free, and the remainder develop recurrent infections of the gums and related oral tissues. Infection is chiefly with anaerobic organisms and can often be successfully treated with antibiotics. Extraction of the teeth usually prevents subsequent infection.

Acatalsic individuals lack the enzyme in all tissues which have thus far been examined; in contrast to its ubiquitous distribution in normal individuals, it is lacking in liver, red cells, muscle, oral mucosa, etc. in acatalsic persons.

Acatalsia is due to homozygosity for a recessive gene. Heterozygotes, called hypocatalasics, have red cell catalase activities, which average about one-half normal. The distribution of red cell catalase activities of the heterozygotes does not overlap the distribution for normal individuals.<sup>5</sup>

This report describes certain properties of cell lines established from skin biopsies of one hypocatalasic and one acatalsic individual. The value of tissue culture cell lines derived from patients with inborn metabolic errors has recently been emphasized by several writers.<sup>6-10</sup> Human euploid cell lines each biochemically marked by the action of a Mendelian gene

#### 緒言

無カタラーゼ血症は、酵素カタラーゼの先天性欠如を特徴とするまれな疾患である。<sup>1-5</sup> 現在では、50以上に及ぶ症例が知られている。これらの症例は、すべて日本で発見されたもので、日本人のほかに朝鮮人1家族が認められているにすぎない。患者の約半数は無症状であるが、残りは歯齦およびその他の口腔組織に繰返し感染を生じる。この感染は、主として嫌気性菌によるもので、抗生物質療法が効果的であることが多い。通常、拔牙によってその後の感染が防止される。

無カタラーゼ血症では、今まで検査したすべての組織にこの酵素が欠如している。正常者では、この酵素が広汎に分布しているのに対し、無カタラーゼ血症では肝臓、赤血球、筋肉、口腔粘膜などにこの酵素が欠如している。

無カタラーゼ血症は、劣性遺伝子に対して同型接合の場合に生じる。異型接合体は低カタラーゼ血症といい、その平均赤血球カタラーゼ活性は正常値の約半分である。異型接合体における赤血球カタラーゼ活性の範囲は、正常者における活性値とは重複しない。<sup>5</sup>

本書では、低カタラーゼ血症および無カタラーゼ血症患者各1名の皮膚片の体外培養で得た細胞系統の特質を若干述べる。先天性代謝異常を有する患者について組織培養で求められた細胞系統の研究を行なうことの価値が、最近数名の著者によって強調されている。<sup>6-10</sup> 人間における体細胞突

may eventually prove useful in the study of genetic changes, such as somatic mutation, transformation, and recombination. The tissues of patients with certain inborn metabolic errors appear at present to be the only source of such mutant lines. Studies analogous to those reported here also have been performed on cell lines established from the tissues of patients with galactosemia.<sup>8,11</sup>

## MATERIALS AND METHODS

### CLINICAL DATA

Cell lines were established from skin biopsies from an acatalasemic, a hypocalasemic, and eight other persons who were normal or had an unrelated disease. Clinical data on these patients are given in Table 1.

TABLE 1 CLINICAL DATA FOR DONORS OF SKIN BIOPSIES USED TO ESTABLISH CELL LINES

表1 細胞系統を得るために使用した皮膚切片の提供者に関する臨床資料

DONOR 提供者	AGE IN YEARS 提供者の年齢	SEX 性	DIAGNOSIS 病名	REFERENCE TO PREVIOUSLY PUBLISHED DATA その細胞系統に関する以前の報告
ACA	60	M 男	ACATALASIA 無カタラーゼ血症	
TAC	28	M 男	HYPOCATALASIA 低カタラーゼ血症	15
BA	30	F 女	MYOSITIS OSSIFICANS 化骨性筋炎	
ITA	40	M 男	NORMAL CONTROL 正常対照	23
DUF	39	M 男	CHRONIC TOPHACEOUS GOUT 慢性結節性痛風	
TDU	11	F 女	GALACTOSEMIA ガラクトース血症	8, 11
MAD	38	F 女	GALACTOSEMIA HETEROZYGOTE ガラクトース血症異型接合体	8, 11
BE	21	F 女	PRIMARY AMYLOIDOSIS 原発性類澱粉症	8, 11, 15
ZOL	12	M 男	WILSON'S DISEASE ウイルソン病	
LBR	11	M 男	GALACTOSEMIA ガラクトース血症	

The normal control ITA cell line was established from biopsy of the skin of an American donor of Japanese origin. Some of the cell lines have been used in other experiments in this laboratory and the appropriate references are given in Table 1.

Figure 1 presents the pedigrees of both the hypocalasemic (TAC) and the acatalasemic (ACA) patients, neither of whom demonstrated symptoms.

然変異, 転移または組換えなどの遺伝的変化の研究に当って, メンデル遺伝子の作用によって生化学的に標識された倍数性細胞系統の追求が有用な手段として何れ認められるかも知れないが, 現在のところ, 特定の先天性代謝異常を有する患者の組織のみについてかかる突然変異細胞系統を求めることが可能である. 本書で報告する研究に類似した研究が, ガラクトース血症患者の組織から得た細胞系統についても実施されている.<sup>8,11</sup>

### 材料および方法

#### 臨床資料

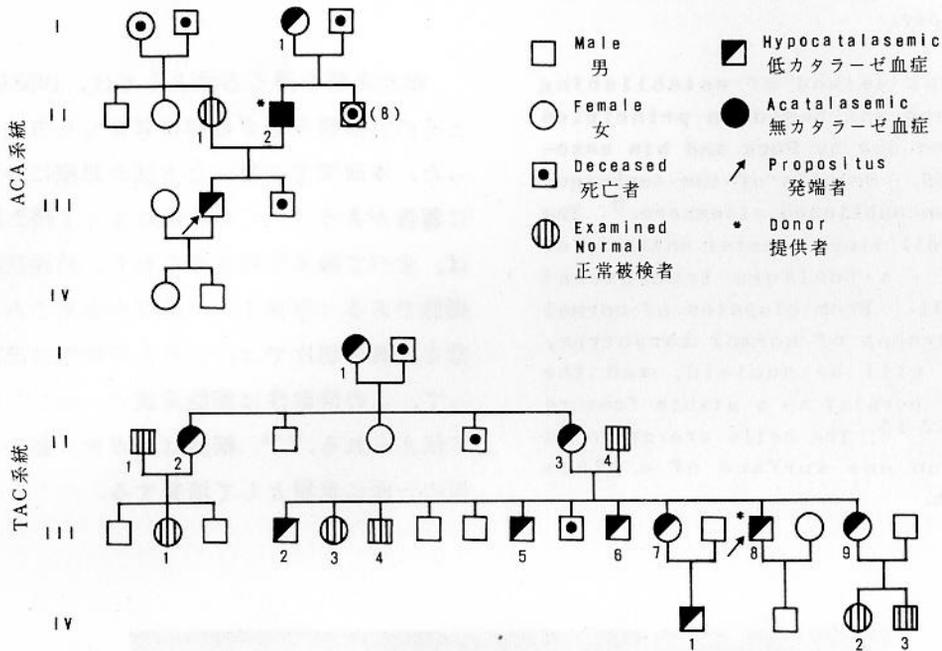
無カタラーゼ血症, 低カタラーゼ血症患者各1名および正常かあるいは本症とは無関係の疾患を有する8名の皮膚切片から, 細胞系統を得た. これらの患者についての臨床資料は表1に示す.

正常対照系統であるITA細胞系統は, 日系米国人の皮膚から求めた. 細胞系統の中には, 本研究所で他の実験に使用したものもあり, それに関する参考資料を表1に示す.

図1は低カタラーゼ血症(TAC)および無カタラーゼ血症(ACA)患者の家系を示す. いずれの例にも症状はなかった.

FIGURE 1 PEDIGREES OF DONOR ACA, ACATALASEMIC; AND DONOR TAC, HYPOCATALASEMIC

図1 低カタラーゼTAC提供者と無カタラーゼACA提供者の家系



Red cell catalase assays performed by a method previously described<sup>5</sup> were as follows:

以前の報告で説明した方法<sup>5</sup>によって赤血球カタラーゼ測定を実施し、その結果は次の通りである。

SUBJECT 被検者

VELOCITY CONSTANT OF RED CELL CATALASE (K<sub>cat</sub>)  
赤血球カタラーゼ反応速度恒数 (K<sub>cat</sub>)

ACA acatalasemic ACA無カタラーゼ血症

0

TAC hypocatalasemic TAC低カタラーゼ血症

2.07

259 Japanese controls Takahara *et al* 259名の日本人対照者 5.38 ± 0.73

#### TECHNIQUES OF CELL CULTURE

#### 細胞培養方法

**GENERAL TECHNIQUES.** All cell lines were established from skin biopsies. In most instances a 4 mm punch biopsy was removed from the skin area. Biopsies of the acatalasemic and the hypocatalasemic patient were performed in Hiroshima. Directly after excision the tissue was cut sterily into sections several millimeters in diameter and placed in glass test tubes with tissue culture medium<sup>12</sup> consisting of 40 per cent N 15, 59 per cent Saline G, and 1 per cent of Puck's antibiotic solution. The tissue was shipped by air

**一般的方法.** すべての細胞系統は皮膚切片から得た。通常、直径4mmの皮膚穿刺標本を取った。無カタラーゼ血症および低カタラーゼ血症者の皮膚切片は広島で取った。組織を切り取った直後に、無菌状態のもとで直径数mmの切片に切って40% N 15, 59% 食塩水Gおよび1% Puck 抗生物質溶液で作られた培養基<sup>12</sup>を入れたガラス試験管内に移す。組織は(機内温度で)ベセズダ市のNational Institutes of Healthに空輸した。そこでこの2つ

at cabin temperature to the National Institutes of Health in Bethesda, and in both cases was processed about 80 hours after the biopsy.

The general method of establishing the cell lines was based on principles originally set out by Puck and his associates in 1958. Details of the technique used have been published elsewhere.<sup>8</sup> The established cell lines consist entirely of fibroblasts - a fusiform transparent cell (Plate 1). From biopsies of normal skin from persons of normal karyotype, these cells will be euploid, and the euploidy will persist as a stable feature of the line.<sup>12-15</sup> The cells are grown as monolayers on one surface of a glass bottle or dish.

の標本は共に切片を取ってから約80時間後に処理された。

細胞系統を得る方法としては、1958年にPuckとその共同研究者が最初に考案した方法に大体従った。本研究室で用いた方法の詳細については別に報告がある。<sup>8</sup> この方法によって得た細胞系統は、すべて線維芽細胞すなわち、紡錘状の透明な細胞である(写真1)。核型が正常である人の正常な皮膚の切片では、これらの細胞は倍数性であって、この倍数性は細胞系統の一定した特質として伝えられる。<sup>12-15</sup> 細胞は、ガラス製の瓶または皿の一面に単層として培養する。



PLATE 1 Photomicrograph of a culture of the ACA acatalasic cell line showing mitosis. Cells are fusiform and transparent. (X150)

写真1 ACA無カタラーゼ細胞系統培養の顕微鏡写真。有糸分裂を示す。細胞は紡錘状かつ透明である。

**SELECTION EXPERIMENTS.** A large bottle (Blake) of cells was subcultured into 50 to 100 smaller (T15) containers. Twenty-four hours after subculturing the cells were washed twice with 3 ml of the following balanced salt solution:

**淘汰実験.** 大瓶 (Blake) に入れて培養した細胞をさらに50から100個の小さい容器 (T15) に分けて二次培養を行なった。二次培養24時間後に細胞を下記の平衡食塩溶液 3 ml で2回洗浄した。

NaCl.....	6.80 grams
KCl.....	0.40 grams
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O.....	0.15 grams
NaHCO <sub>3</sub> .....	2.20 grams
Distilled water to make 蒸留水を加えて	.... 1 liter

The cells were then overlaid with 2 ml of the above solution now containing varying concentrations of hydrogen peroxide. The solution was incubated with the cells for 20 minutes at 37° C and was then poured off. The cells were washed once with 3 ml of growth medium; then incubated with fresh growth medium and fed every 72 hours.

The concentrations of hydrogen peroxide used were:

$0.8 \times 10^{-5}$  Molar,  $0.8 \times 10^{-4}$  Molar,  $0.8 \times 10^{-3}$  Molar

After the second wash with the balanced salt solution, and before exposure to hydrogen peroxide, six bottles were frozen for subsequent determination of cell protein. Thereafter, three of the bottles exposed to each concentration of hydrogen peroxide were frozen every 72 hours. Cell proteins in the selection experiments were determined by the method of Oyama and Eagle.<sup>16</sup> For graphs the unit of cell protein is defined as an amount of protein giving the same optical density as 0.1 mg of bovine albumin. These experiments simultaneously employed acatalasemic cells and normal cells so that they might be washed and treated with the same solutions and fed with same media.

#### CHEMICAL DETERMINATIONS

After the first two or three subcultures, the cells were transferred to large bottles. When a confluent monolayer formed, the cells were subcultured. Periodically a bottle was removed for assay of cell catalase. The cells were harvested when the monolayer was confluent, as in subculturing, and a single bottle usually yielded between 5 and 10 mgs of cell protein.

次は細胞の上に上記の溶液に種々の濃度の過酸化水素を加えたものを2ml流し入れる。細胞と共に37°Cで20分間培養した後上層液を流し出し、細胞を培養基3mlで一度洗浄した。それから新鮮な培養基中で培養し、72時間毎に培養基を補給した。

使用した過酸化水素の濃度は次の通りである。

平衡食塩溶液で2回目の洗浄が終わって過酸化水素で処理する前に、この中から6本の瓶をとり出して冷凍し、後で細胞蛋白量を測定するために使った。各濃度の過酸化水素を加えた後は72時間毎に瓶を3本ずつとって冷凍した。淘汰実験における細胞蛋白量測定は、Oyama および Eagle<sup>16</sup>の方法で実施した。成績の作図に当って、牛アルブミン 0.1mgと同一光学的濃度を呈する蛋白量を細胞蛋白量の単位として用いた。これらの実験では、無カタラーゼ細胞と正常細胞とを同一溶液で洗浄および処理し、かつ同一培養基を使用できるように両者を同時に扱った。

#### 化学的定量

最初の2乃至3回の二次培養の後に、細胞を大瓶に移した。細胞の連続した単層が形成されると、二次培養を行なった。定期的に瓶を1本ずつ取り出して、細胞カタラーゼの測定を行なった。二次培養における場合と同様に、連続した単層が生じた時に細胞を採取し、1本の瓶からは通常5から10mgの細胞蛋白が得られた。

The cells were digested from the glass with a 0.05 per cent trypsin solution,<sup>8</sup> spun at 1500 rpm for five minutes, the trypsin was removed and the cells were then washed three times in 0.85 per cent sodium chloride. After the final wash the cells were suspended in 5 to 15 ml of 0.05 molar potassium phosphate buffer (pH7) and transferred to a plastic nonconical centrifuge tube (Spinco). After placing the tube in a beaker of ice, the cells were disrupted with a Mullard probe sonicator, which was energized during 4 periods of 30 seconds' duration each. Between each pulse the suspension was allowed to cool at least 30 seconds; and at no time did the temperature within the tube exceed 10° C. When a large number of tubes were processed the probe was chilled with ice after every eight pulses. In most instances control cells and acatalasic or hypocatalasic cells were processed simultaneously.

Following cellular disruption 2 ml aliquots of the solution were removed and transferred to a Beckman cuvette for a spectrophotometric assay of the catalase activity of the sonicate. The method employed was that of Beers and Sizer<sup>17,18</sup> and has been used previously on cultured cells.<sup>19</sup>

Thirty per cent H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher Scientific Company) was diluted in 0.01 M KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> buffer (pH=7) to 0.03 molar. Then 1 ml of this dilution was added to the 2 ml aliquot of cellular sonicate in the cuvette. Following addition of the hydrogen peroxide optical density was taken at 10 second intervals at 2400 Å in a model DU Beckman spectrophotometer. The first reading was obtained 10 seconds after the introduction of peroxide into the cuvette. The net change in optical density for the first minute was computed as

$$\Delta (OD) = \frac{(OD)_{10''} - (OD)_{60''}}{5/6}$$

where the two terms in the numerator refer to optical density at 10 and 60 seconds respectively. The individual readings were

細胞を5%トリプシン溶液<sup>8</sup>で消化してガラス瓶から出し、5分間1500rpmで遠心分離を行なってトリプシンを除去した。それから細胞を0.85%塩化ナトリウムで3回洗浄した。最終洗浄後に5ないし15mlの0.05モル燐酸カリウム緩衝液(pH7)を用いて細胞浮遊液を作り、プラスチック製の非円錐形遠心分離管 (Spinco) に移した。この管を氷の入ったビーカーに入れて、Mullard 探針状超音波処理器による処理を30秒間ずつ4回行なって細胞を破壊した。超音波処理を1回行なうごとに浮遊液を少なくとも30秒間冷却させたが、管内温度が10°Cを超えたことは一度もなかった。多数の管を処理する場合には、超音波処理器を8回使うごとに氷で冷却した。たいいていの場合には、対照細胞および無カタラーゼあるいは低カタラーゼ細胞を同時に処理した。

細胞を破壊したのちに、溶液2mlを取ってBeckmanクヴェットに移し、超音波処理物の分光光度計検査を実施した。検査はBeersおよびSizerの方法<sup>17,18</sup>に従って行なった。これは以前にも培養した細胞の検査に用いたことがある。<sup>19</sup>

30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fisher Scientific Company) を0.01モルKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>緩衝液(pH=7)で0.03モルになるように希釈した。それからこの希釈液1mlをクヴェット中の超音波処理細胞液2mlに加えた。過酸化水素を加えた後で光学的濃度DU型Beckman分光光度計を2400Åにして10秒間隔で測定した。最初の測定は、過酸化水素をクヴェットに入れ10秒して行なった。最初の1分間中の正味の光学的濃度の変化は次の式の如く計算した。すなわち、

この式で、分子における2つの数はそれぞれ10秒および60秒後の光学的濃度を示す。各検査におけ

also plotted in each assay to determine whether the initial reaction rate was constant over this time interval, and could therefore be used to quantitate enzyme activity. Assays were run in triplicate. A millimolar extinction coefficient of 0.040 was used for hydrogen peroxide.

A 0.2 ml aliquot of the cellular sonicate was taken for determination of the cell protein by Lowry's method.<sup>20</sup>

Using the computed change in optical density over one minute, the millimolar extinction coefficient of hydrogen peroxide and the concentration of cell protein in the cuvette, the specific activity of catalase in the cellular sonicate was obtained. This latter figure was then multiplied by 60 to give a virtual quantity: micromoles of hydrogen peroxide reduced per hour per milligram cell protein. Except where otherwise specified, this unit of cell catalase activity will be employed in the graphs and tables to follow and has also been used by Lieberman and Ove.<sup>19</sup>

During 60 seconds virtually no spontaneous reduction of hydrogen peroxide was noted, when the cellular sonicate was not added to the cuvette. The spectrophotometer readings were corrected for a protein blank.

## RESULTS

### CATALASE ASSAY

**GENERAL PROPERTIES.** In Figure 2, the 10 second optical density readings from a typical assay are plotted against time. It will be noted that the curve is linear. In Figure 3 catalase activity is plotted against the quantity of cell protein in the cuvette, using the ITA line. The relationship of catalase activity to cell protein is linear and the line passes through the origin.

る個々の読みを製表して最初の反応速度がこの期間中一定であるか否か、また酵素活性を定量化する上でそれを使用し得るか否かを決定した。同一標本について検査を3回くり返した。過酸化水素には0.040ミリモルの吸光係数を使用した。

超音波処理細胞液0.2mlを取ってLowryの方法<sup>20</sup>により細胞蛋白量の定量を行なった。

1分間におたる光学的濃度の変化の計算値、過酸化水素のミリモル吸光係数およびクヴェット中の細胞蛋白の濃度を用いて、超音波処理細胞液におけるカタラーゼの活性を求めた。それからこの数字を60倍して仮想量を得た。1時間につき細胞蛋白1mgによって分解される過酸化水素のマイクロモルが得られた。別に明記した場合を除いて、図表では細胞カタラーゼ活性の単位としてはこの値を用いる。これはLiebermanおよびOve<sup>19</sup>も使用したものである。

超音波処理細胞液をクヴェットに加えない場合には、60秒間では実質的には過酸化水素の自然分解を認めない。分光光度計の測定値は蛋白がない場合について補正してある。

## 結果

### カタラーゼ測定の特質

**検査の一般的特質.** 図2において、典型的な検査の1例における10秒毎の光学的濃度測定値と時間との関係を図示したが直線型であることをみとめる。図3ではITA細胞系統を用いてカタラーゼ活性とクヴェット中の細胞蛋白量との関係を図示してある。カタラーゼ活性と細胞蛋白との関係は直線型であり原点を通る。

FIGURE 2 KINETICS OF HYDROGEN PEROXIDE REDUCTION IN CELLULAR SONICATE SOLUTION

図2 超音波処理細胞溶液における過酸化水素還元反応

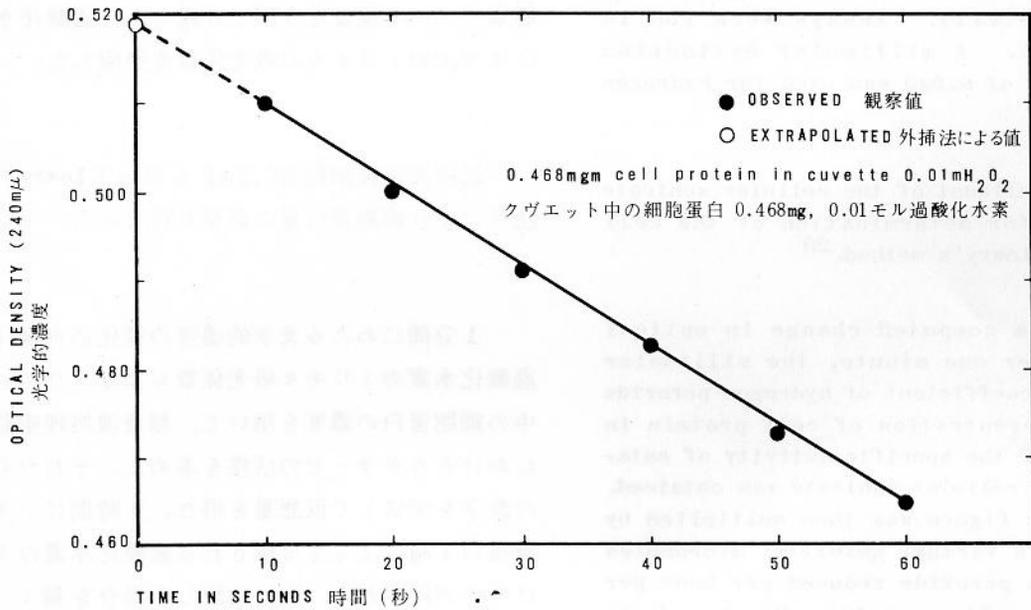
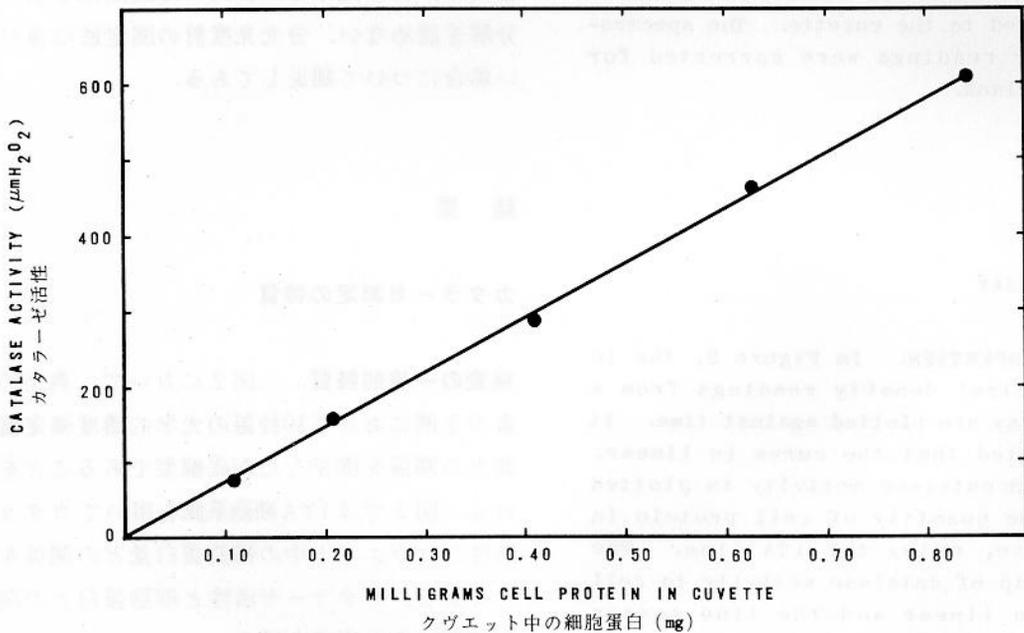


FIGURE 3 RELATIONSHIP OF CATALASE ACTIVITY TO CONCENTRATION OF PROTEIN IN ITA CELL LINE

図3 ITA細胞系統における蛋白濃度とカタラーゼ活性との関係



In order to inquire further whether the measured catalase activity could be assumed to be proportional to the quantity of catalase present in the sonicate, the following experiment was performed. Crystalline beef liver catalase (Biochemica Behringer) was dissolved in the buffer described above and diluted to approximately  $2 \times 10^{-5}$  mg/ml. A solution of sonicate from cells of the ITA line was also prepared with a protein concentration of 0.417 mg/ml. These two solutions were combined in varying proportions to give a total volume of 2 ml in each cuvette. One milliliter of 0.03 molar hydrogen peroxide was added to each cuvette.

Observed catalase activity was compared with theoretical activity computed from the known values for the two separate solutions. The data are shown in Table 2. Agreement will be noted between the theoretical and observed values, suggesting that the concentration of crystalline catalase can be accurately measured in the presence of the cellular sonicate.

カタラーゼ活性の測定値が超音波処理液中のカタラーゼ量に比例するか否かをさらに調べるために次の実験を行なった。結晶牛肝臓カタラーゼ (Biochemica Behringer) を上述の緩衝液で溶解して、約  $2 \times 10^{-5}$  mg/ml になるまで希釈した。ITA系統の細胞の超音波処理溶液も蛋白濃度 0.417 mg/ml になるよう作成した。この2つの溶液を種々の割合で混合して、各クヴェット中の全容積を 2 ml にした。0.03モル過酸化水素 1 ml を各クヴェットに加えた。

カタラーゼ活性の観察値を、この2つの溶液について別々に求められている。値から計算した理論的な活性値と比較した。この資料は図2に示した。理論値と観察値とはよく一致している。このことは超音波処理細胞のある場合にも結晶カタラーゼの濃度が正確に測定し得ることを示唆する。

TABLE 2 COMPARISON OF OBSERVED AND THEORETICAL CATALASE ACTIVITY IN MIXTURES USING CELL SONICATE AND CRYSTALLINE CATALASE

表2 超音波処理細胞液と結晶カタラーゼを用いた混合液におけるカタラーゼ活性観察値と理論値との比較

SOLUTIONS ADDED TO CUVETTE IN MILLILITERS クヴェットに加えた液の量 (ml)			CATALASE ACTIVITY カタラーゼ活性	
CRYSTALLINE CATALASE 結晶カタラーゼ液	SONICATE ITA CELL LINE 超音波処理したITA細胞系統	0.03 MOLAR HYDROGEN PEROXIDE 0.03モル過酸化水素液	OBSERVED* 観察値	THEORETICAL 理論値
2	0	1.0	428	428
1.5	0.5	1.0	491	497
1.0	1.0	1.0	558	564
0.5	1.5	1.0	624	636
0	2.0	1.0	702	702

\*Micromoles per hour per 3 ml of solution (the total volume in the cuvette).  
溶液 3 ml (クヴェット中の総量) について1時間当りのμモル

ROLE OF EXTRANEOUS VARIABLES IN DETERMINING THE CATALASE ACTIVITY OF A CELL LINE. A number of variables have been examined to determine whether they influence the catalase activity of the cell lines. The chief variables studied were:

細胞系統のカタラーゼ活性測定における外部的変数の役割。若干の変数を検討してそれが細胞系統のカタラーゼ活性に影響を及ぼすか否かを決定した。調査した主な変数は次の通りであった。

The age of the cell line

細胞系統の経過日数

## The number of subcultures

The estimated<sup>8</sup> number of times the cells increased in culture.

The interval between enzyme assay and last subculture, i.e., the number of days the cells were in the bottle.

No significant effect of any of these variables on the catalase activity of the lines was found. The data on the effect of age of the line is typical and will subsequently be discussed in more detail.

Triplicate assays of catalase activity during each determination gave almost no variation in results. Assays of bottles of the same cell line on different days did not, however, give precisely the same values. The coefficient of variation (standard deviation x 100 divided by the mean) lies between 10 and 18 per cent, the value depending on the cell line. The acatalasic line is an exception. No variation in the results from this cell line could be detected by this method.

## CATALASE VALUES

Table 3 presents the mean catalase activities of the cell lines employed. Activity, computed as described previously, is expressed as micromoles of hydrogen peroxide reduced per hour per milligram of cell protein. The control cell lines differ in range of ages and in numbers of subcultures. Some of the lines are older, while others are younger, than the hypocatalasic and acatalasic cell lines, and corresponding variation is seen in the number of subcultures. These two parameters, however, appear to have no discernible affect on the catalase activity. Figure 4 graphs the distribution of catalase activity for the eight normal lines (38 determinations), the hypocatalasic line (15 determinations) and the acatalasic line (8 determinations). The three presumptive genotypes do not overlap. In Table 4 the data are summarized. It will be seen that activity for the acata-

## 二次培養の回数

培養中における細胞の推定増加率<sup>8</sup>

最終二次培養から酵素測定までの期間, すなわち細胞が瓶中にあった日数

これらの変数のいずれも細胞系統のカタラーゼ活性に対して有意な影響を及ぼしているとは認められなかった. この中で典型的なものは細胞系統の経過日数の影響についての資料であり, 後に一層詳細に述べる.

同一標本について, カタラーゼ活性の測定を3回行なったが, その結果には殆んど変動がなかった. しかし, 同一細胞系統を異なった日に検査した場合には, その値は正確には同じではなかった. 変動係数(標準偏差を100倍して平均値で除した数)は10%と18%の間であって, その値は細胞系統によって異なる. 無カタラーゼ細胞系統は例外で, 本法ではこの細胞系統に関する結果には変動は検出できなかった.

## 若干の細胞系統におけるカタラーゼ値

表3には, 使用した細胞系統の平均カタラーゼ活性値を示す. 上述の如く計算した活性の単位としては1時間につき細胞蛋白1mgによって還元される過酸化水素のマイクロモル値を用いた. 対照細胞系統ではそれぞれ経過日数, 二次培養の回数が異なる. 細胞系統の中には, 低カタラーゼおよび無カタラーゼ細胞よりも経過日数の長いものもあり, また短いものもあり, それに応じて二次培養の回数も異なる. しかしながら, これらの2つの助変数はカタラーゼ活性に対して判別し得る程度の影響を及ぼさないように見受けられる. 図4には8つの正常細胞系統(測定の数38), 低カタラーゼ細胞系統(測定の数15)および無カタラーゼ細胞系統(測定の数8)におけるカタラーゼ活性値の分布を示す. 3つの仮定遺伝子型の間には重複はない. 表4に資料を総括してある. 無カタラーゼ細胞系統における活性は0であったこ

lastic cell line was zero. The ratio of the mean activity of the heterozygous line to the mean activity of the normal cell lines was 0.28.

とがわかる。異型接合性細胞系統の平均活性と正常細胞系統の平均活性との比は、0.28であった。

TABLE 3 NUMBER OF DETERMINATIONS, AGE, AND MEAN CATALASE ACTIVITY FOR EACH CELL LINE

表3 各細胞系統の測定数、年齢および平均カタラーゼ活性

CELL LINE 細胞系統	NUMBER OF DETERMINATIONS 測定数	AGE OF CELL LINE DAYS 細胞系統の年齢	SUBCULTURES* NUMBER 二次培養回数	CATALASE ACTIVITY MEAN 平均カタラーゼ活性	STANDARD ERROR OF MEAN 平均値の標準誤差
ACA ACATALASIC ACA無カタラーゼ血症	7	33-93	4-11	0	0
TAC HYPOCATALASIC TAC低カタラーゼ血症	15	78-182	3-13	211.2	± 14.0
BA NORMOCATALASIC BA正常カタラーゼ血症	11	61-126	3-12	756.4	± 56.3
ITA NORMOCATALASIC ITA正常カタラーゼ血症	9	29-104	3-14	675.9	± 42.2
DUF NORMOCATALASIC DUF正常カタラーゼ血症	3	73-78	3	669.0	± 46.1
JDU NORMOCATALASIC JDU正常カタラーゼ血症	4	286-307	21-24	844.2	± 50.3
MAD NORMOCATALASIC MAD正常カタラーゼ血症	2	284-306	19-22	883.0	± 113.0
BE NORMOCATALASIC BE正常カタラーゼ血症	2	303-308	34-35	1109.0	± 109.0
ZOL NORMOCATALASIC ZOL正常カタラーゼ血症	3	29-40	3-5	546.0	± 33.2
LBR NORMOCATALASIC LBR正常カタラーゼ血症	4	36-53	4-6	612.5	± 55.7
-- HELA (LP-8)	7	--	--	712.0	± 42.1

\*Number of times the cells have been subcultured at the time they are harvested for assay. Catalase activity is expressed as micromoles of hydrogen peroxide reduced per hour per milligram cell protein.

検査のために細胞を取るまでに細胞を二次培養した回数。カタラーゼ活性は、細胞蛋白/mg当り1時間について還元された過酸化水素のマイクロモルであらわす。

FIGURE 4 DISTRIBUTION OF CATALASE ACTIVITY FOR NORMOCATALASIC, HYPOCATALASIC, AND ACATALASIC CELL LINES

図4 正常カタラーゼ、低カタラーゼ、無カタラーゼ細胞系統における特定のカタラーゼ活性値の頻度

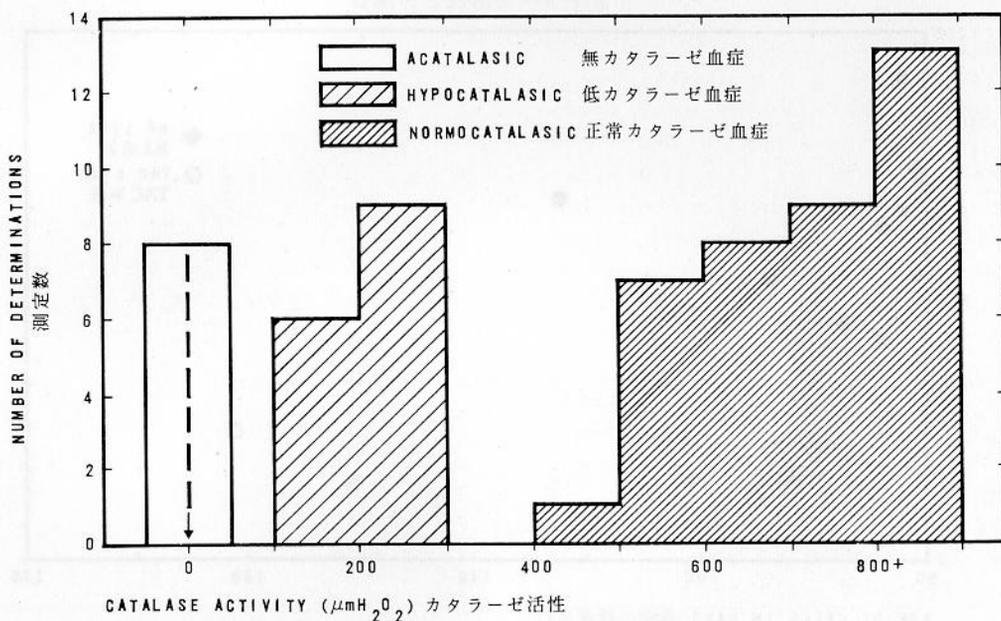


TABLE 4 SUMMARY OF MEAN CATALASE ACTIVITY FOR ACATALASIC, HYPOCATALASIC, AND NORMOCATALASIC CELL LINES

表4 無カタラーゼ, 低カタラーゼおよび正常カタラーゼ細胞系統の平均カタラーゼ活性の総括

DONOR 提供者	CELL LINES NUMBER 細胞系統の数	DETERMINATIONS NUMBER 測定の数	CATALASE ACTIVITY MEAN 平均カタラーゼ値	STANDARD ERROR OF MEAN 平均値の標準誤差
ACATALASIC 無カタラーゼ血症	1	7	0	0
HYPOCATALASIC 低カタラーゼ血症	1	15	211.2	± 14.0
NORMOCATALASIC 正常カタラーゼ血症	8	38	762.0	± 21.0

$$\frac{\text{hypocatalasieic 低カタラーゼ血症}}{\text{normocatalasieic 正常カタラーゼ血症}} = 0.28$$

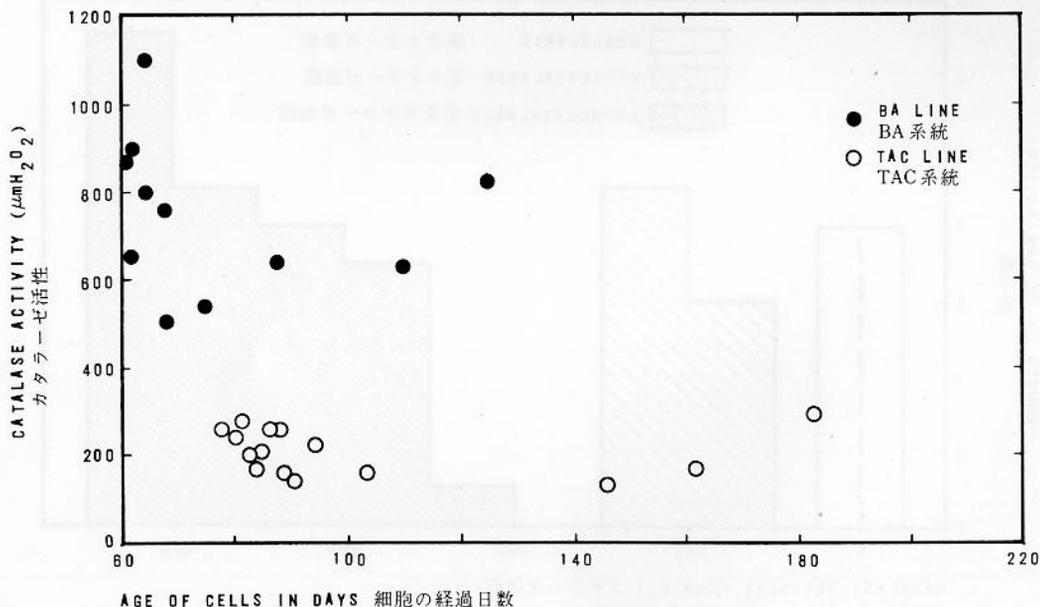
In Figure 5, catalase activity of the TAC hypocatalasieic cells and of the BA normal cells are plotted against the cell age. There is a suggestion from the graph that the catalase activity may fall as the cell line ages. However, the small effect is not statistically significant, and does not impair discrimination between the lines. The product-moment correlation coefficients for age and catalase activity are:

図5において, TAC低カタラーゼ細胞およびBA正常細胞のカタラーゼ活性と細胞系統の経過日数との関係を示してある. この図表から, 細胞系統が古くなるにつれてカタラーゼ活性が低下するのではないかということが示唆される. しかしながらこの僅かな影響は統計的に有意ではなく, 各細胞系統間の区別に影響を及ぼすものではない. 年齢およびカタラーゼ活性に対する生成物-モーメント相関係数は次の通りである.

CELL LINE 細胞系統	CORRELATION COEFFICIENT 相関係数
TAC hypocatalasieic TAC低カタラーゼ血症	-0.165
BA normal BA正常	-0.137

FIGURE 5 CATALASE ACTIVITY RELATED TO AGE FOR BA NORMOCATALASIC AND TAC HYPOCATALASIC CELL LINES

図5 BA正常カタラーゼ細胞系統とTAC低カタラーゼ細胞系統の経過日数とカタラーゼ活性との関係



Assuming the population correlation equals zero, using the 'z' transformation<sup>21</sup> the probability of obtaining sample correlation coefficients as large as these, by chance, is greater than 0.5 for both cell lines.

In several experiments catalase and lactic acid dehydrogenase were measured in aliquots from the same cellular sonicate. The data are shown in Table 5. The three genotypes appear to be distinguishable by the ratio of catalase activity to lactic acid dehydrogenase activity. The mean catalase activity of the normal lines is about 750 micromoles of peroxide reduced per hour per milligram cell protein. This figure represents the catalase activity of approximately  $7 \times 10^{-5}$  milligrams of crystalline beef heart catalase. Assuming human cultured cell catalase and beef heart catalase have nearly the same molecular weight and equivalent activity, human cell catalase can be said to approximate 0.01 per cent of the cell protein. The fact that cultured cells have less catalase activity than many intact tissues has been noted by other authors.<sup>19,22</sup>

It is of interest also that the medium in which the cells were grown contained 12 per cent pooled human serum, and had considerable catalase activity. One milliliter of medium could decompose roughly 7 micromoles of hydrogen peroxide

人口相関が0に等しいならば、z 転換法<sup>21</sup>を使用すれば、この程度の標本相関係数が偶然得られる確率は両細胞系統とともに0.5よりも大である。

同一超音波処理細胞液についてカタラーゼおよび乳酸脱水素酵素を測定した。その資料を表5に示す。カタラーゼ活性と乳酸脱水素酵素活性との比によって、3つの遺伝子型が区別できるように思われる。正常細胞系統の平均カタラーゼ活性は、1時間につき細胞蛋白1mg当りの過酸化水素還元が約750マイクロモルである。この数字は、結晶牛心臓カタラーゼ約 $7 \times 10^{-5}$  mgのカタラーゼ活性に相当する。人の培養細胞カタラーゼと牛心臓カタラーゼが殆んど同一分子量であり、かつ同等の活性を有すると仮定するならば、人間では、細胞蛋白のほぼ0.01%が細胞カタラーゼであるといえる。培養細胞のカタラーゼ活性が、もとのままの組織における活性よりも低いことが多いということが他の研究で認められている。<sup>19,22</sup>

細胞の培養に用いた培養基に、種々の人から集めた人血清が12%含まれ、かなりのカタラーゼ活性があったことも興味がある。1mlの培養基は1時間につき約7マイクロモルの過酸化水素を

TABLE 5 COMPARISON OF LACTIC ACID DEHYDROGENASE AND CATALASE ACTIVITIES IN SELECTED CELL LINES

表5 淘汰した細胞系統における乳酸脱水素とカタラーゼ活性との比較

CELL LINE 細胞系統	SUBCULTURE 二次培養の回数	AGE OF CELL LINE DAYS 経過日数	LDH ACTIVITY 細胞蛋白のLDH活性	CATALASE ACTIVITY 細胞蛋白のカタラーゼ活性	RATIO 比 CATALASE:LDH カタラーゼ:LDH
ITA NORMOCATALASIC ITA正常カタラーゼ血症	6	49	146.2	834	5.7
BA NORMOCATALASIC BA正常カタラーゼ血症	13	143	162.0	834	5.1
DUF NORMOCATALASIC DUF正常カタラーゼ血症	4	75	73.5	761	10.3
TAC HYPOCATALASIC TAC低カタラーゼ血症	12	115	103.0	142	1.4
TAC HYPOCATALASIC TAC低カタラーゼ血症	14	132	96.0	160	1.7
ACA ACATALASIC ACA無カタラーゼ血症	6	37	160.0	0	0

per hour. The cells assayed were grown in 75-100 milliliters of medium, which was changed every 72 hours. It is notable that there was about as much catalase activity in the medium as in a milligram of cell protein. However, after several months of growth in such media, no catalase activity could be found in the protein of acatalasic cells.

#### MIXING EXPERIMENTS

To determine whether acatalasic cells might contain a demonstrable inhibitor of catalase activity, mixing experiments were performed. A sonicate of acatalasic cells was mixed in varying proportions with a sonicate of cells of the normal ITA line. Catalase activities were determined on the mixtures and on the two sonicates separately. Theoretical values were computed assuming no inhibitor. The data are set out in Table 6, and are plotted in Figure 6. The observed and theoretical values agree, and the catalase activity of the normal cell sonicate was not reduced by the presence of the acatalasic sonicate. Nor did the presence of the acatalasic sonicate in the mixture increase catalase activity over the theoretical value - which might occur if the normal ITA sonicate released the enzyme in the acatalasic sonicate. From Table 6 it is possible to compute the catalase activity of the synthetic heterozygote - the sonicate containing half normal and half acatalasic protein. The values are:

SONICATE	Synthetic heterozygote -	observed value	CATALASE ACTIVITY	266
超音波処理物	化学的に合成された異型接合体	観察値	カタラーゼ活性	
		theoretical value		244
		理論値		
	Actual heterozygote TAC-	mean of 15 determinations		211
	実際の TAC 異型接合体	測定数 15 の平均値		

These values have been compared merely to show there are no gross differences between them.

Analogous experiments were performed for the hypocatalasic cell line combining sonicates of the BA and TAC cell lines. The same result was obtained as that described above.

還元する能力があった。検査した細胞は培養基 75-100ml 中に培養し、培養基は 72 時間ごとに取り換えた。細胞蛋白 1 mg とほぼ同じカタラーゼ活性が培養基にあることは注目される。しかしながら、このような培養基で数ヶ月培養した後でも、無カタラーゼ細胞の細胞蛋白中にカタラーゼ活性を認めることができなかった。

#### 混合実験

無カタラーゼ細胞には検出できるようなカタラーゼ活性抑制因子を含んでいるか否かを決定するために、混合実験を実施した。超音波処理無カタラーゼ細胞を、種々の割合で正常 ITA 系統の超音波処理細胞と混合した。混合標本および 2 つの超音波処理細胞を別々にカタラーゼ活性を測定した。抑制因子がない場合の理論的活性値を計算した。資料は表 6 および図 6 に示す。観察値および理論値は一致しており、超音波処理を施した正常細胞のカタラーゼ活性は、超音波処理無カタラーゼ細胞の混入によって減少しなかった。超音波処理を施した正常 ITA が、超音波処理無カタラーゼ細胞中に酵素を放出してカタラーゼ活性を増加せしめるかも知れないと考えられたが、混合標本中に超音波処理無カタラーゼ細胞があっても、カタラーゼ活性は理論値以上に増加しなかった。表 6 によって化学的に合成された異型接合体、すなわち正常蛋白および無カタラーゼ蛋白を半量ずつ含む超音波処理物のカタラーゼ活性を計算することが可能である。その値は次の通りである。

上記の値を比較したのは、単にその各々の間に大きな差のないことを示すためであった。

超音波処理 BA および TAC 細胞系統を混合して同様の実験を低カタラーゼ細胞系統について実施したら、上述したのと同じ結果を得た。

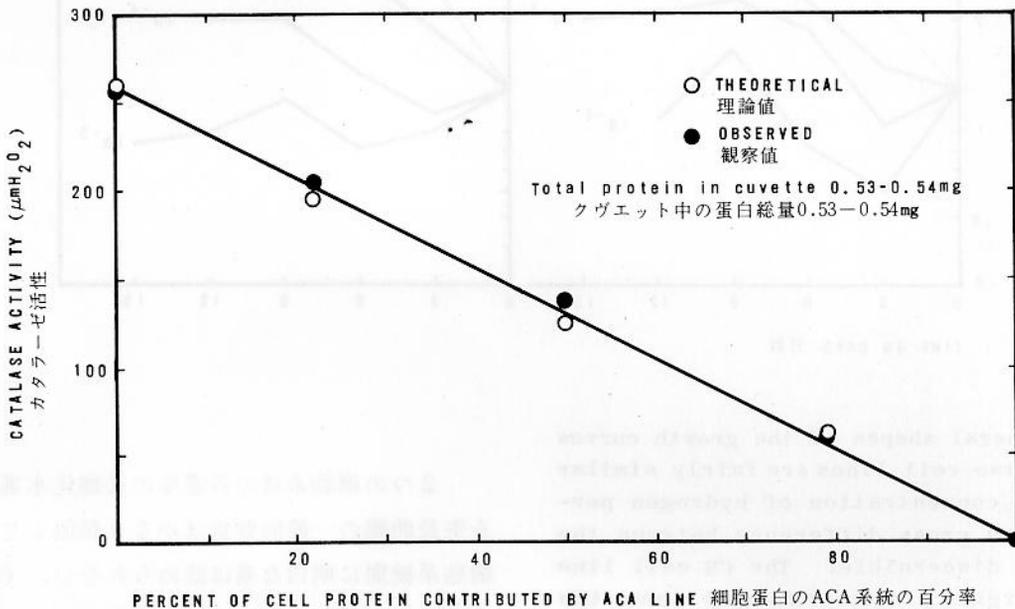
TABLE 6 COMPARISON OF OBSERVED AND THEORETICAL CATALASE ACTIVITY IN MIXTURES OF ACATALASIC AND NORMAL CELL LINES

表6 無カタラーゼ細胞系統と正常細胞系統との混合液におけるカタラーゼ活性の観察値と理論値との比較

PROTEIN IN CUVETTE クヴェット中の蛋白量				CATALASE ACTIVITY カタラーゼ活性	
ITA CELL LINE ITA系統 mg	ACA CELL LINE ACA系統 mg	TOTAL 計 mg	ACA %	OBSERVED 観察値	THEORETICAL 理論値
0.529	0	0.529	0	256	256
0.397	0.135	0.532	24	198	193
0.265	0.270	0.535	50	140	128
0.133	0.405	0.538	77	63	65
0	0.540	0.540	100	0	0

FIGURE 6 CATALASE ACTIVITY FOR MIXTURES OF CELL SONICATES OF ITA NORMOCATALASIC AND ACA ACATALASIC CELL LINES

図6 ITA正常カタラーゼ細胞系統とACA無カタラーゼ細胞系統の超音波処理細胞混合液のカタラーゼ活性



#### SELECTION EXPERIMENTS

Figure 7 plots the results of one selection experiment. The CB cell line, the control in this experiment, was developed from the skin biopsy of a 38 year old man with alcaptonuria. The cells were 56 days old at the beginning of the experiment and had a catalase activity of 1122. The acatalasac ACA cells were 105 days old. The initial cell protein was

#### 淘汰実験

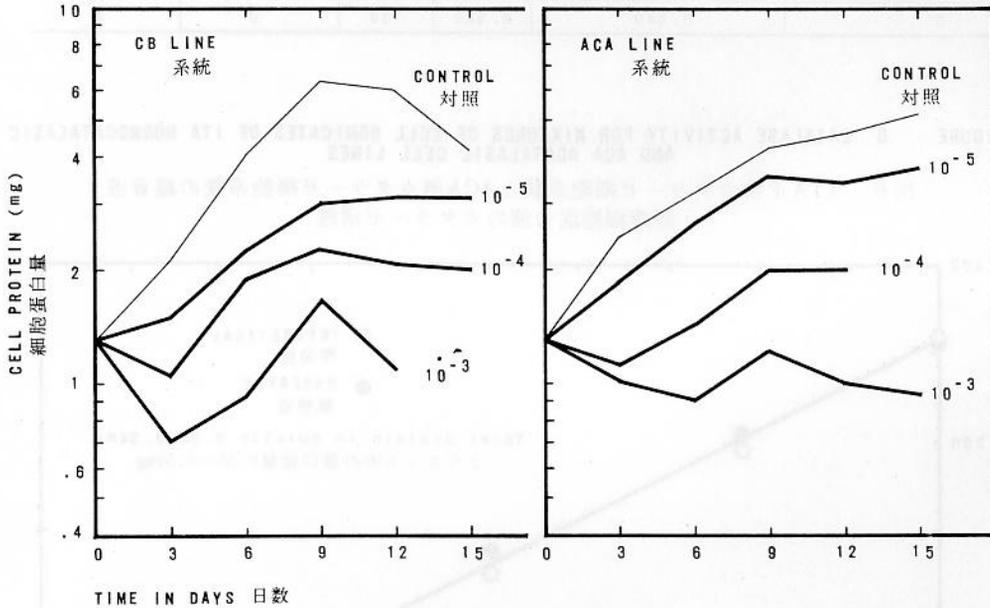
図7には、1つの淘汰実験の結果を示した。この実験においてCB細胞系統を対照として用い、これはアルカプトン尿症の38才の男性の皮膚切片から得たものである。実験開始時に細胞は56日を経過しており、そのカタラーゼ活性は1122であっ

the same for both lines.\* The cells were treated, as described (Page 5) with hydrogen peroxide at zero time. The increase in cell protein after exposure to the experimental concentrations of hydrogen peroxide was then followed.

た。無カタラーゼACA細胞は105日を経過していた。最初の細胞蛋白量は、両系統とも同じであった。\* 細胞は前述の如く(5頁) 時間0において過酸化水素で処理した。種々の濃度の過酸化水素で処理した後の細胞蛋白の増加を追述した。

FIGURE 7 MILLIGRAMS OF CELL PROTEIN IN CB NORMOCATALASIC AND ACA ACATALASIC CELLS FOLLOWING TWENTY MINUTE EXPOSURE TO VARYING CONCENTRATIONS OF HYDROGEN PEROXIDE

図7 各濃度の過酸化水素で20分間処理した後に於けるCB正常カタラーゼ細胞とACA無カタラーゼ細胞の細胞蛋白量 (mg)



The general shapes of the growth curves for the two cell lines are fairly similar for each concentration of hydrogen peroxide. No gross difference between the lines is discernible. The CB cell line grew slightly more rapidly than the acatalasemic ACA line. With the concentration of hydrogen peroxide at  $0.8 \times 10^{-4}$  molar, both cell lines were able to double the initial protein but could not grow further.

2つの細胞系統の各濃度の過酸化水素に対する生長曲線の一般的形状はかなり類似している。細胞系統間に明白な差は認められない。CB系統の生長は、無カタラーゼACA系統のそれよりも僅かに急速であった。  $0.8 \times 10^{-4}$  モル濃度の過酸化水素で両細胞系統とも最初の蛋白量が倍になったが、それ以上の増加を示さなかった。

\*The value for the cell protein includes an increment (about 0.5 units) contributed not by the cells but by the protein in the medium. However, what is important for this experiment is that the true initial cell protein can be assumed to be the same for both lines and for all the different concentrations of hydrogen peroxide.

細胞蛋白量は実際よりはやや高く(約0.5単位)、これは細胞自体によるのではなく培養基中の蛋白が原因である。しかしながら、本実験で重要なのは両細胞系統および各濃度の過酸化水素に対して最初の真の細胞蛋白量が同一であると仮定し得ることである。

These experiments and others tend to suggest that acute exposure to hydrogen peroxide will not preferentially select against acatalasic cells, at least not to a readily measurable extent. Chronic exposure to low concentrations is at present rendered difficult, owing to the high quantity of protein (and other reducing substances) in the medium which tend to promptly reduce the peroxide.

## DISCUSSION

Acatalasia appears to persist as a recognizable defect in cells growing in culture and may therefore be used as a biochemical marker in genetic experiments. At present, acatalasic human cells have no counterpart in microbial genetics and might eventually be of help in elucidating the physiologic function (if any) of catalase at the cellular level. Since ionizing radiation is sometimes thought to affect cells through the creation of hydrogen peroxide, the radiation sensitivity of these mutant lines may also be of interest.

Present inability to develop a system for selecting against these cells limits their usefulness as tools in genetics. When the function of an enzyme is not clearly known, it is difficult to effectively challenge cells lacking the enzyme. On the other hand, galactosemic cells can be selected against in culture under conditions where normal cells will grow.<sup>8</sup> The simultaneous use of both these techniques should permit more elaborate genetic experiments than would be possible with either one singly.

## SUMMARY

Acatalasia, a disease due to homozygosity for a Mendelian gene, is characterized by the absence of the enzyme catalase from the tissues of the human body. Red cells from heterozygotes have enzyme activities about one-half normal. In this report, the development of cell lines from skin biopsies of an affected homozygote, a

上記の実験やその他の実験の結果では、高濃度の過酸化水素による1回の処理で少なくとも容易に測定し得る程の無カタラーゼ細胞の選択的淘汰は起らないことを示唆する傾向がある。過酸化水素を急速に還元する傾向のある多量の蛋白(および還元作用をするその他の物質)が培養基に含まれているため、低濃度の過酸化水素による慢性的処理は現在のところ困難である。

## 考 按

無カタラーゼ血症は、細胞の組織培養において増殖している細胞に検出できる欠陥として伝えられるように見受けられるので、遺伝学的実験における生化学的指標として利用できるかも知れない。現在のところ、人間の無カタラーゼ細胞に対応するものは微生物遺伝学にはなく、最終的にはカタラーゼに生理学的機能があるとすれば、細胞の段階においてそのような機能の解明に役立つかも知れない。電離放射線のために過酸化水素が発生することにより細胞に影響が起るとの考えもあるので、これらの突然変異系統の放射線感受性も興味ある問題かも知れない。

現在のところ、これらの細胞を淘汰する方法を考案できないために、遺伝学的研究における手段としてのその有用性を限定している。ある酵素の機能がはっきり知られていない場合には、その酵素を欠く細胞の生存能を有効的に検索することは困難である。他方においてガラクトース血症細胞は、正常細胞が生長する培養条件の下において淘汰できる。<sup>8</sup> これらの方法を併用することによって、いずれか一方を単独で用いる場合よりも一層精巧な遺伝学的実験を行なうことができるはずである。

## 総 括

無カタラーゼ血症はメンデル遺伝子に対する同型接合体による疾患で、人体組織に酵素カタラーゼの欠如していることをその特徴とする。異型接合体の赤血球には、正常量の約半分の酵素活性がある。本書では同型接合体1名、異型接合体1名

heterozygote and eight control patients is described. The cell type is the euploid fibroblast.

It was found that acatalasemic cells lacked the enzyme, even after growing for many months in a medium rich in catalase. The control lines all had mean catalase activity double or more that of the heterozygous line. Selection experiments, measuring growth of cells exposed for 20 minutes to varying concentrations of hydrogen peroxide, did not provide a system for preferentially eliminating acatalasemic cells.

Certain other experiments were performed bearing on the enzymatic defect in this disease.

および対照患者8名の皮膚切片より求められた細胞系統について述べた。細胞型は倍数性線維芽細胞である。

無カタラーゼ細胞は、カタラーゼに富む培養基で数カ月間培養した後でも酵素を欠如していることが認められた。すべての対照系統の平均カタラーゼ活性は、異型接合系統の2倍乃至それ以上であった。種々の濃度の過酸化水素で処理した細胞の生長を測定する淘汰実験の結果では、選択的に無カタラーゼ細胞を淘汰する方法は得られなかった。

本疾患における酵素の欠陥に関係あるその他の若干の実験を実施した。

## REFERENCES

### 参考文献

1. Takahara, S.: Progressive oral gangrene probably due to lack of catalase in the blood (acatalasemia). Report of nine cases. *Lancet* 2:1101-1104, 1952.  
(血液カタラーゼ欠乏(無カタラーゼ血症)に因るとされる歯性進行性壊疽性顎骨炎, 9症例の報告)
2. Takahara, S.: Progressive oral gangrene, due to acatalasemia. (colored motion picture) *Laryngoscope* 64:685-688, 1954.  
(無カタラーゼ血症に因る歯性進行性壊疽性顎骨炎)
3. Nishimura, E.T., Hamilton, H.B., et al: Carrier state in human acatalasemia. *Science* 130:333-334, 1959.  
(人間における無カタラーゼ血症の保因状態)
4. Wyngaarden, J.B., and Howell, R.R: Acatalasia. The Metabolic Basis of Inherited Disease, edited by J.B. Stanbury, J.B. Wyngaarden, and D.B. Frederickson, New York, McGraw Hill 1960.  
(無カタラーゼ症. 遺伝的疾患の背景となる代謝状態)
5. Takahara, S., Hamilton, H.B., et al: Hypocatalasemia: A new genetic carrier state. *J Clin Invest* 39:610-619, 1960.  
(低カタラーゼ血症: 新しい遺伝的保因状態)
6. Kalckar, H.M.: Biochemical genetics as illustrated by hereditary galactosemia, Ciba Foundation Symposium on Human Biochemical Genetics in Relation to the Problem of Gene Action, edited by G.E.W. Wolstenholme and C.M. O'Connor. Boston, Little, Brown & Co., 1959.  
(遺伝性ガラクトース血症を中心とした生化学的遺伝学の考察)
7. Luria, S.E.: Panel discussion on the approach to tissue culture.  
(組織培養の方法に関する討議)
8. Krooth, R.S., and Weinberg, A.N.: Studies on cell lines developed from the tissues of patients with galactosemia. *J Exp Med* 113:1155-1172, 1961  
(ガラクトース血症患者の組織から得た細胞系統についての研究)
9. Salzman, N.P.: Animal cell cultures. Tissue culture is a powerful tool in the study of nutrition, physiology, virology, and genetics. *Science* 133:1559-1565, 1961.  
(動物細胞培養: 組織培養は栄養学, 生理学, ウイルス学および遺伝学の研究における有力な手段である)
10. Levintow, L., and Eagle, H.: The technique of mammalian cell culture. *Methods in Enzymology*, edited by S.P. Colowick and N.O. Kaplan. New York, Academic Press, (in press)  
(哺乳類動物の細胞培養の技術. 酵素学における方法)
11. Krooth, R.S., and Weinberg, A.N.: Properties of galactosemic cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun* 3: 518-524, 1960.  
(培養におけるガラクトース血症細胞の性質)
12. Puck, T.T., Cieciura, S.J., and Robinson, A.: Genetics of somatic mammalian cells. 3. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med* 108: 945-956, 1958.  
(哺乳動物体細胞の遺伝: 人間および動物の倍数性細胞の長期培養)
13. Tjio, J.H., and Puck, T.T.: The somatic chromosomes of man. *Proc Nat Acad Sci USA* 44:1229, 1958.  
(人間の体細胞染色体)
14. Hsu, T.C., and Kellogg, D.S.: Primary cultivation and continuous propagation in vitro of tissues from small biopsy specimens. *J Nat Cancer Inst.* 25:221-235, 1960.  
(組織の小切片の一次培養と連続培養)

15. Krooth, R.S., and Tjio, J.H.: The biosynthesis of poliovirus by euploid "Fibroblasts" of non-neoplastic origin. *Virology* 14:289-291, 1961.  
(非新生物の倍数性線維芽細胞による灰白炎ウイルスの生合成)
16. Oyama, V.I., and Eagle, H.: Measurement of cell growth in tissue culture with a phenol reagent (Folin-Ciocalteu). *Proc Soc Exp Biol Med* 91:305-307, 1956.  
(フェノール試薬 (フォリン・シオカルテュ) による組織培養における細胞生長の測定)
17. Beers, R.F., and Sizer, I.W.: A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. *J Biol Chem* 195:133-140, 1952.  
(カタラーゼによる過酸化水素分解の分光光度測定法)
18. Maehly, A.C., and Chance, B.: The assay of catalases and peroxidases. *Methods of Biochemical Analysis*, edited by D. Glick, New York, Interscience Publishers, 1954. Vol. 1, p. 357-424.  
(カタラーゼと過酸化酵素の分析. 生化学的分析方法)
19. Lieberman, I., and Ove, P.: Enzyme activity levels in mammalian cell cultures. *J Biol Chem* 233:634-636, 1958.  
(哺乳動物細胞培養における酵素活性)
20. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., et al: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275, 1951.  
(フォリン・フェノール試薬による蛋白測定)
21. Fisher, R.A.: *Statistical Methods for Research Workers*. New York, Hafner Publishing Co., 1950.  
(研究員のための統計的方法)
22. Peppers, E.V., Westfall, B.B., Kerr, H.A., and Earle, W.R.: Note on the catalase activity of several mammalian cell strains after long cultivation in vitro. *J Nat Cancer Inst* 25:1065-1068, 1960.  
(長期培養後における若干の哺乳動物細胞系統のカタラーゼ活性についての覚書)
23. Krooth, R.S., Tobie, Y., Tjio, J.H., and Goodman, H.C.: The reaction of certain human sera with mammalian chromosomes. *Science* (in press).  
(若干の人血清の哺乳動物染色体に対する反応)