

THE 'CATALASE PROTEIN' OF ACATALASEMIC RED BLOOD CELLS

無カタラーゼ赤血球のカタラーゼ蛋白

An Electrophoretic and Immunologic Study

電気泳動的ならびに免疫学的研究

SHIGEO TAKAHARA, M.D. (高原滋夫)

MASANA OGATA, M.D. (緒方正名)

THOMAS Y. KOBARA, B.A.

EDWIN T. NISHIMURA, M.D.

W. JANN BROWN, 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。

THE 'CATALASE PROTEIN' OF ACATALASEMIC RED BLOOD CELLS

無カタラーゼ赤血球のカタラーゼ蛋白

An Electrophoretic and Immunologic Study

電気泳動的ならびに免疫学的研究

SHIGEO TAKAHARA, M.D.¹ (高原滋夫)

MASANA OGATA, M.D.¹ (緒方正名)

THOMAS Y. KOBARA, B.A.²

EDWIN T. NISHIMURA, M.D.³

W. JANN BROWN, M.D.³

From the Department of Otolaryngology, Okayama University
School of Medicine,¹ and ABCC Departments of Clinical Laboratories²
and Pathology³

岡山大学医学部¹ならびにABCC臨床検査部²および病理部³



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)

EDITOR'S NOTE

編集者記

A paper based on this report appeared in the following journal

この報告書に基づく論文は下記の雑誌に掲載された

Laboratory Investigation Vol. 11 No. 9, 1962

CONTENTS

目 次

| | | |
|-----------------------|---------|----|
| Introduction | 緒 言 | 1 |
| Materials and Methods | 材料および方法 | 2 |
| Results | 結 果 | 4 |
| Discussion | 考 按 | 10 |
| Summary | 総 括 | 11 |
| References | 参考文献 | 13 |

FIGURES

挿入図

| | | |
|-----------|--|----|
| Figure 1. | Tiselius electrophoretic pattern of crude catalase solution extracted from normal red blood cells | 5 |
| 図 | 健康者赤血球から抽出した粗カタラーゼ液の電気泳動像 | |
| 2. | Paper electrophoretic patterns of a crude and purified catalase solution compared with normal human serum pattern | 5 |
| | 粗カタラーゼ液および精製カタラーゼ液と正常人血清の電気泳動像比較 | |
| 3. | Densitometric studies of paper electrophoretic strips of crude catalase extracts from both normal blood and acatalasemic blood | 7 |
| | 正常血液および無カタラーゼ血液から得た粗カタラーゼ抽出液の滷紙電気泳動像の濃度測定 | |
| 4. | Stage 2 solution isolated from normal and acatalasemic red blood cells, compared with purified catalase solution | 7 |
| | 正常血液および無カタラーゼ血液から得た第2階梯液と精製カタラーゼ液の比較 | |
| 5. | Paper electrophoresis of red blood cell hemolysates from acatalasemic, hypocatalasemic, and normal subjects | 7 |
| | 無カタラーゼ血液、低カタラーゼ血液および正常血液の赤血球溶血産物の滷紙電気泳動像 | |
| 6. | Starch block electrophoresis of crude catalase solution purified from normal red blood cells | 8 |
| | 正常赤血球から精製した粗カタラーゼ液の澱粉ブロック電気泳動像 | |
| 7. | Diagram of microprecipitin ring tests | 8 |
| | 微量沈降輪環試験図 | |
| 8. | Quantitative precipitin curve showing reaction of purified catalase with catalase antibody | 8 |
| | カタラーゼ抗体による精製カタラーゼの反応を示す定量沈降曲線 | |
| 9. | Schema postulated to explain the faster component in electrophoretic patterns | 11 |
| | 電気泳動像における移動速度の早い構成部の説明想定図 | |

THE 'CATALASE PROTEIN' OF ACATALASEMIC RED BLOOD CELLS

無カタラーゼ赤血球のカタラーゼ蛋白

An Electrophoretic and Immunologic Study

電気泳動的ならびに免疫学的研究

INTRODUCTION

Acatalasemia, first described by Takahara and Miyamoto¹ in 1948, is a rare hereditary constitutional abnormality²⁻⁵ characterized by a deficiency of catalase in the blood. The most striking characteristic of this defect is that acatalasemic blood turns brownish black immediately upon the addition of hydrogen peroxide, owing to the formation of methemoglobin. Recently, a hypocatalasemic state was described by Nishimura *et al.*⁶ and Takahara *et al.*⁷ In this last condition the level of catalase activity was found to be about one-half that of normal blood. Genetically hypocatalasemia appears to be heterozygous, or a carrier state for the acatalasemic gene.

The precise nature of the biochemical defect in acatalasemia is unknown, but the study of certain aspects of the defect is possible. Three possibilities can be considered: catalase may be totally absent in these individuals; it may be present but inhibited by some extraneous factor; or a substitute catalase-like molecule may be enzymatically inactive because of a structural defect in the molecular arrangement of the enzyme.

In a series of experiments catalase protein was studied in patients with acatalasemia, hypocatalasemia, and normal blood; electrophoretic, immunochemical and spectrophotometric techniques were employed. The results of these studies of the acatalasemic and normal blood are herewith presented.

緒言

1948年高原および宮本¹によって初めて紹介された無カタラーゼ血症は、血液中のカタラーゼ欠如を特徴とする珍しい遺伝性体質異常²⁻⁵である。その最も顕著な特徴は、無カタラーゼ血液に過酸化水素水を添加するとメトヘモグロビンを形成してその血液が直ちに黒褐色に変色することである。最近、Nishimuraら⁶および高原ら⁷によって低カタラーゼ血症の報告が行なわれたが、この場合のカタラーゼ活性値は正常血液のその約半分であった。遺伝学的には、低カタラーゼ血症は異型接合体性、すなわち無カタラーゼ因子保因状態を示すもののように思われる。

無カタラーゼ血症の生化学的異常の真の性格についての詳細は不明であるが、この異常のある面の研究は可能である。すなわち、それらの人には全くカタラーゼが欠如しているか、あってもなんらかの外因性要因によってそれが抑圧されているか、または酵素の分子配列の構造に欠陥があって代りのカタラーゼ様分子が酵素として働かないか、の3つの可能性がそれである。

カタラーゼ蛋白の研究は無カタラーゼ血症者、低カタラーゼ血症者、および正常血液者について行ない、電気泳動法、免疫化学、および分光光度計による方法を用いて実施した。無カタラーゼ血液および正常血液に関するこれら研究の結果をここに報告する。

MATERIALS AND METHODS

Normal erythrocytes were obtained from citrated whole human blood of normal persons and acatalasemic erythrocytes were taken from acatalasemic persons.

The technique employed in the extraction of crude catalase solution is essentially the same as the method by Herbert and Pinsent.⁸ In this procedure the supernatant of the ethanol-chloroform extract was dialyzed against distilled water overnight, after which the dialysate was frozen and dried. The powder was dissolved in distilled water. Details of the procedure used in the purification of catalase are shown.

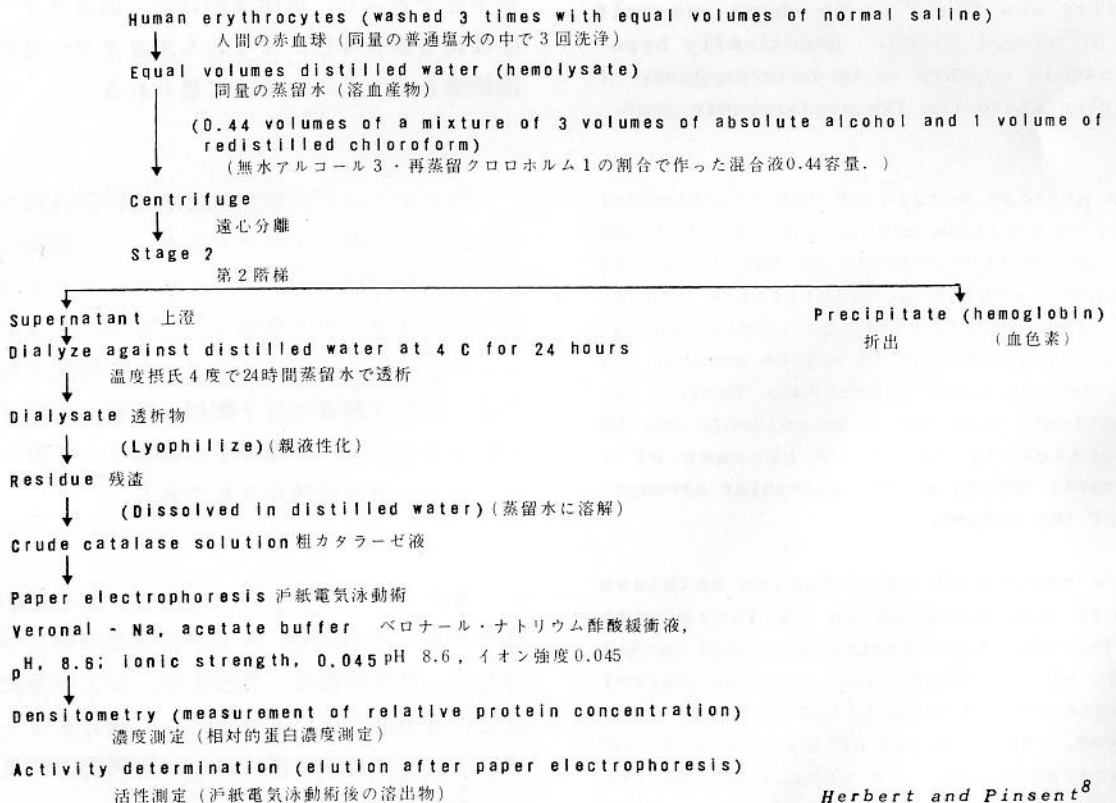
材料および方法

正常赤血球は健康者のクエン酸添加全血から、また無カタラーゼ赤血球は無カタラーゼ血症者から採った。

粗カタラーゼ液抽出法は Herbert-Pinsent 法⁸ と大体同じである。この方法は、エタノール・クロロホルム抽出液の上澄を一晩蒸留水で透析し透析物を凍結、乾燥する。その粉末を蒸留水に溶かす。カタラーゼ精製法の詳細は下に示す通りである。

PROCEDURE USED IN THE PURIFICATION OF CATALASE

カタラーゼ精製法



Filter paper electrophoresis was performed according to the techniques of Grassmann *et al*^{9,10} using von Holt's buffer¹¹ at pH 8.6 and with ionic strength of 0.045. The migration time varied from 5 to 8 hours. The paper was then divided into 2 strips parallel to the direction of migration. One of the strips was dried at room temperature and immersed in a mixture of 0.05% bromphenol blue, 1.0% $HgCl_2$, and 2.0% acetic acid. Excess bromphenol blue was removed by washing 3 times with 2.0% acetic acid. After the paper strip was redried, a densitometric curve was drawn with the use of an automatic recorder.

The remaining paper strip was cut into multiple pieces 1 cm in width at right angles to the direction of current flow. These pieces of strip were washed twice with 0.5 ml of physiologic saline solution, so as to elute the catalase. Serial dilutions were then made of the eluate to an end point indicated by the lack of reaction with hydrogen peroxide. The number of dilutions of the eluate was used as an index of catalase activity (Fig. 3).

Electrophoresis was also accomplished in a Tiselius apparatus (Hitachi), with an analytical cell designed by Tiselius and Longworth.¹² These migration experiments were performed in Veronal buffer at pH 8.6 with ionic strength of 0.1, at a potential gradient of 4.0 to 4.5 volts/cm. The duration of the experiment was 3 hours.

Starch blocks were prepared by the method described by Kunkel.¹³ The protein concentration of each section of the blocks was determined by the method of Folin and Ciocalteu.¹⁴ The procedure of Euler and Josephson¹⁵ was used to assay the catalase activity in the eluted sections of the blocks.

Catalase antibody was formed in the following manner: purified catalase solution (stage 5 of the procedure of Herbert and Pinsent⁸) derived from normal

濾紙電気泳動法は、 pH 8.6, イオン強度 0.045の von Holt 緩衝液¹¹ を用い、Grassmann ら^{9,10} が採用した方法によって実施した。移動時間は5時間から8時間にわたった。次に濾紙を移動の方向と平行に2分断した。その一片を室温で乾燥し、0.05%ブロムフェノール青、1.0% $HgCl_2$, および2.0%酢酸の混合液中に浸した。過剰ブロムフェノール青は2.0%酢酸液で3回洗い落した。この紙片を再乾燥し、自動記録器にかけて濃度曲線を得た。

他の一片は移動の方向と直角に刻んで1cm幅の細片とした。これら細片を0.5mlの生理的食塩水で2回洗浄し、カタラーゼを溶出した。この溶出物で過酸化水素水による反応が無くなる点まで倍数希釈液を作った。希釈液の倍数はカタラーゼ活性の指数として用いた(図3)。

電気泳動法は更に Tiselius および Longworth¹² 案出の分析器を装備した Tiselius 装置(日立製)による方法も実施した。この移動実験は、 pH 8.6, イオン強度0.1のペロナール緩衝液を用い、電位傾斜1cm当り4.0 - 4.5 Vで実施した。実験に要した時間は3時間であった。

澱粉ブロックは Kunkel 法¹³ によって作成し、ブロックから作った各切片の蛋白濃度を Folin - Ciocalteu 法¹⁴により測定した。またこれらブロックで作った溶出物切片のカタラーゼ活性の測定には Euler - Josephson 法¹⁵を用いた。

カタラーゼ抗体は次の方法で作った。まず健康人赤血球から精製カタラーゼ液 (Herbert - Pinsent 法⁸ 第5階梯液) を作って抗原とする。

human erythrocytes was used as the antigen. Purified catalase, 2 mg was emulsified with Freund's adjuvant;¹⁶ 1 ml of this mixture was injected intramuscularly into rabbits at weekly intervals for 8 weeks.

Microprecipitin ring tests were performed by means of Boyd's technique.¹⁷ Quantitative precipitin test curves¹⁸⁻²⁰ were obtained by adding 1 ml of purified catalase solution of various concentrations to 1 ml of anti-catalase rabbit serum. This mixture resulted in a precipitate. Test tubes containing such precipitates were kept in an incubator at 37 C for 1 hour, and then placed in a refrigerator at 4-10 C for 12 hours. The sediments were centrifuged and washed 3 times with cold saline. The precipitated protein was analyzed by use of a method described by MacPherson and Heidelberger;²¹ this method is really a modification of the Folin-Ciocalteu test.¹⁴ Optical density of the blue coloration was determined by use of the Beckman model DU spectrophotometer at a wave length of 700 $m\mu$, 30 minutes after the addition of the Folin reagent to the precipitates. The resulting curve is shown in Figure 8.

Catalase protein of 2 normal and 2 acatalasemic persons was quantitatively measured by adding extracts of the red blood cells of each to the same antibody. In a manner similar to that described above, the optical density at 700 $m\mu$ was determined and the quantities of protein were calculated from the above standardized quantitative precipitin curve.

RESULTS

The Tiselius electrophoretic pattern (ascending boundaries) of the crude catalase foundation extracted from red blood cells (stage 2, Herbert and Pinsent⁸) of normal human beings may be seen in Figure 1. A low peak of fast mobility which is probably all catalase and a main peak of slower mobility representing hemoglobin may be observed.

この精製カタラーゼ液 2 mg を Freund 補助液¹⁶ で乳状化した。乳状混合液 1 ml を 1 週間ごとに 8 週間家兎に筋注した。

微量沈降輪環試験は Boyd 法¹⁷ によって実施した。それぞれ濃度の異なる精製カタラーゼ液 1 ml を家兎の抗カタラーゼ血清 1 ml に加えて定量沈降反応曲線¹⁸⁻²⁰ を得た。この混合液に生じた沈降物を試験管に入れて 37 C の恒温槽内に 1 時間置き、次いで 4-10 C の冷蔵庫内に 12 時間入れた。できた沈渣を遠心分離し、冷塩水で 3 回洗浄した。沈降蛋白は MacPherson-Heidelberger 法²¹ で分析した。この方法は実際は Folin-Ciocalteu 反応¹⁴ の変法である。青色着色部の吸光度測定は、沈降物に Folin 試薬添加後 30 分して、Beckman DU 型分光光度計を用い、波長 700 $m\mu$ で実施した。その結果得た曲線は図 8 に示す通りである。

健康人 2 名および無カタラーゼ血症者 2 名から得たカタラーゼ蛋白の定量は、各人の赤血球抽出物を同じ抗体に加えて行なった。上記と同様の方法で波長 700 $m\mu$ における吸光度を求め、上記標準化定量沈降曲線により蛋白量を算定した。

結 果

健康者の赤血球から抽出した粗カタラーゼ液 (Herbert-Pinsent 法⁸ 第 2 階梯液) によって得た Tiselius 電気泳動像 (上昇界面) を図 1 に示す。おそらくすべてカタラーゼである移動速度が早くて低いピークと、血色素を示す移動速度の遅い主ピークをここに見ることができる。

An illustration of the paper electrophoretic pattern of crude catalase extract obtained from normal blood may be noted in Figure 2. Two peaks comparable with those obtained by the use of the Tiselius technique can be seen here. Comparison with the control paper strip of human blood serum indicates that the faster peak in Figure 2B has the same mobility as β -globulin in normal human serum. Figure 2C shows the paper electrophoresis of purified catalase (stage 5, Herbert and Pinsent⁸), which possesses the same mobility as the faster peak in Figure 2B. In Figure 2B it appears that the main peak consists of hemoglobin, because this peak showed the same mobility as hemoglobin in other tests. Figure 3 shows the densitometric curve and the eluted catalase activity paper electrophoretic curve of a crude catalase solution (stage 2, Herbert and Pinsent⁸) taken from normal blood. This curve makes evident the localization of catalase activity in the faster peak.

健康者赤血球から得た粗カタラーゼ抽出液の濾紙電気泳動像を図2に示す。Tiselius 電気泳動像のピークに対応する2つのピークをここに見ることができる。これを対照紙片における人間血清の場合と比較してみれば、図2Bの移動速度の早いピークが健康者血清の β -グロブリンと同じ移動度を持っていることがわかる。図2Cは図2Bの移動速度の早いピークと同じ移動度を持つ精製カタラーゼ液 (Herbert-Pinsent 法⁸ 第5階梯液) の濾紙電気泳動像を示す。図2Bでは、その主ピークは他の試験における血色素と同じ移動度を示しているから、血色素によって成り立っているものであろう。図3は正常血液における粗カタラーゼ液 (Herbert-Pinsent 法⁸ 第2階梯液) の濃度曲線および溶出カタラーゼ活性濾紙電気泳動曲線を示す。この曲線によってカタラーゼ活性が移動速度の早いピークの部にのみ存在することが明白である。

FIGURE 1 TISELIUS ELECTROPHORETIC PATTERN OF CRUDE CATALASE SOLUTION EXTRACTED FROM NORMAL RED BLOOD CELLS

図1 健康者赤血球から抽出した粗カタラーゼ液の Tiselius 電気泳動像

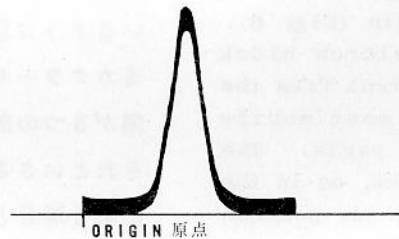
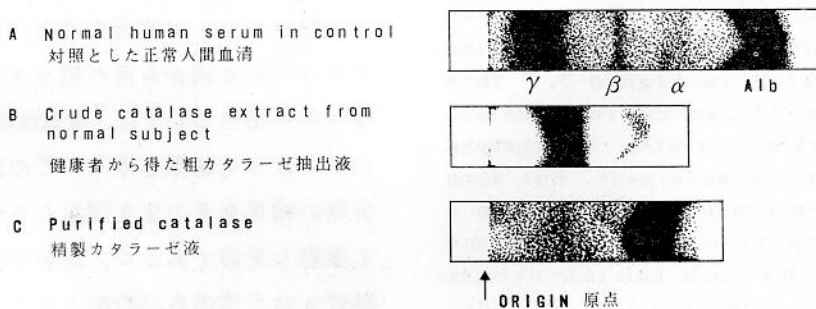


FIGURE 2 PAPER ELECTROPHORETIC PATTERNS OF A CRUDE AND PURIFIED CATALASE SOLUTION COMPARED WITH NORMAL HUMAN SERUM PATTERN

図2 粗カタラーゼ液および精製カタラーゼ液と正常人血清の電気泳動像比較



A paper strip of stage 2 solutions extracted from normal and acatalasemic blood is shown in Figure 4, in comparison to a purified catalase solution. No catalase activity is seen in the extract from acatalasemic blood. The intensity of staining of the faster peak in the acatalasemic extract is weaker than that of the normal extract. Figure 3 illustrates the densitometric curves of the paper strips shown in Figure 4. Protein concentration of the faster peak in the extract obtained from normal blood was 15.4%, compared with 8.1% for the acatalasemic extract as determined by the method of Folin and Ciocalteu.¹⁴

The paper electrophoretic patterns of hemolysates of normal, hypocatalasemic, and acatalasemic blood are shown in Figure 5. On the basis of electrophoretic mobility there appears to be no abnormality in the hemoglobin itself, since all 3 hemolysates show a single peak having the same mobility.

Starch block electrophoresis of crude catalase solution (stage 2) extracted from normal blood appears to give better resolution than paper electrophoresis in revealing the catalase protein (Fig. 6). The catalase peak in the starch block preparation is slightly different from the paper pattern in that the most mobile component is divided into 3 parts. The faster peaks in the starch block, as in the paper strips and Tiselius method, possess the catalase activity.

The immunologic reactions between the anti-catalase rabbit serum and the crude catalase solution from the blood of normal and acatalasemic subjects when tested by the microprecipitin ring tests gave the results indicated in Figure 7. This figure is an exact schematic reproduction of an actual series of tests. Photographs of the actual tests were made, but were difficult to reproduce. Tube a shows a distinct precipitate obtained in the reaction between the crude catalase extract of normal erythrocytes and the antibody;

正常血液および無カタラーゼ血液の第2階梯抽出液、滷紙電気泳動像と、精製カタラーゼ液電気泳動像の比較を図4に示す。無カタラーゼ血液抽出液にはカタラーゼ活性は全く認められない。また、無カタラーゼ血液における移動速度の早いピークの染色濃度は正常血液のそれよりも弱い。図3は図4における各滷紙電気泳動像の濃度曲線を示したものである。Folin-Ciocalteu法¹⁴で測定した移動速度の早いピークの蛋白濃度は正常血液抽出液においては15.4%であったが、無カタラーゼ血液抽出液においては8.1%であった。

正常血液、低カタラーゼ血液、および無カタラーゼ血液の各溶血産物について、その電気泳動像を図5に示す。電気泳動像に現われた移動度から見れば、どの溶血産物にも移動度の等しい単一のピークが認められるから、血色素そのものには異常はないものと思われる。

正常血液から抽出した粗カタラーゼ液(第2階梯液)の澱粉ブロック電気泳動像は、滷紙電気泳動像よりもカタラーゼ蛋白の解明力がすぐれているように思われる(図6)。澱粉ブロックによるカタラーゼのピークは、最も移動度の高い構成部が3つの部分に分れている点で、滷紙泳動像のそれといささか異なる。滷紙およびTiselius法による場合と同じく、カタラーゼ活性は澱粉ブロックにおける移動速度の早いピークにも認められる。

抗カタラーゼ家兔血清と、正常血液および無カタラーゼ血液から得た粗カタラーゼ液の間の免疫学的反応については、微量沈降輪環試験では図7に示すような結果を得た。この図は一連のテスト実施の結果をそのまま図示したものである。写真も撮影したのであるが、複製が困難であった。試験管aは正常赤血球の粗カタラーゼ抽出液と抗体

FIGURE 3 DENSITOMETRIC STUDIES OF PAPER ELECTROPHORETIC STRIPS OF CRUDE CATALASE EXTRACTS FROM BOTH NORMAL BLOOD AND ACATALASEMIC BLOOD

図3 正常血液および無カタラーゼ血液から得た粗カタラーゼ抽出液の
 滬紙電気泳動像の濃度測定

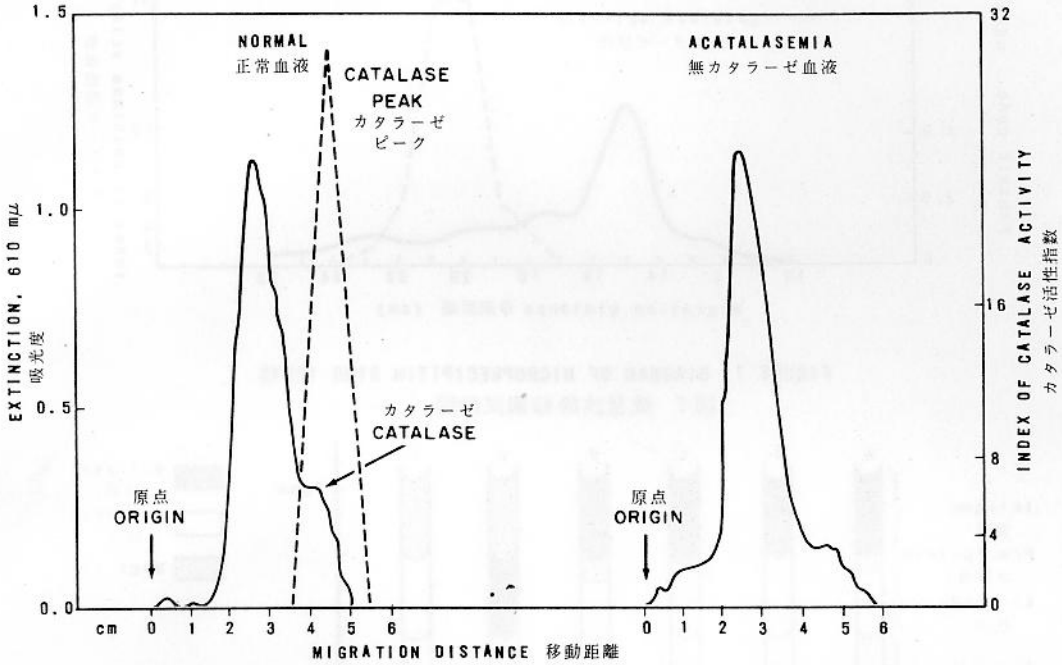


FIGURE 4 STAGE 2 SOLUTION ISOLATED FROM NORMAL AND ACATALASEMIC RED BLOOD CELLS, COMPARED WITH PURIFIED CATALASE SOLUTION

図4 正常血液および無カタラーゼ血液から得た第2階梯液と精製カタラーゼ液の比較

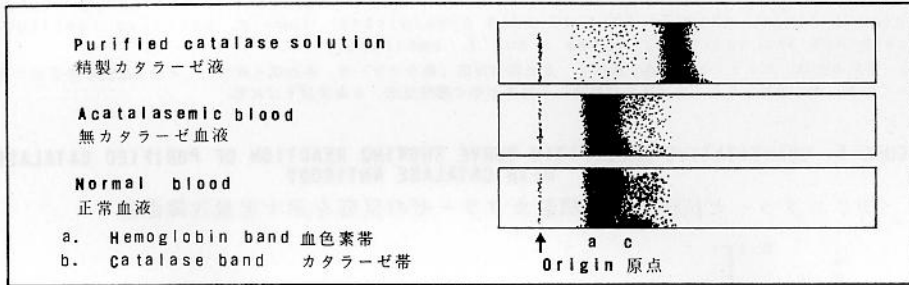


FIGURE 5 PAPER ELECTROPHORESIS OF RED BLOOD CELL HEMOLYSATES FROM ACATALASEMIC, HYPOCATALASEMIC, AND NORMAL SUBJECTS

図5 無カタラーゼ血液、低カタラーゼ血液および正常血液の赤血球溶血産物の滬紙電気泳動像

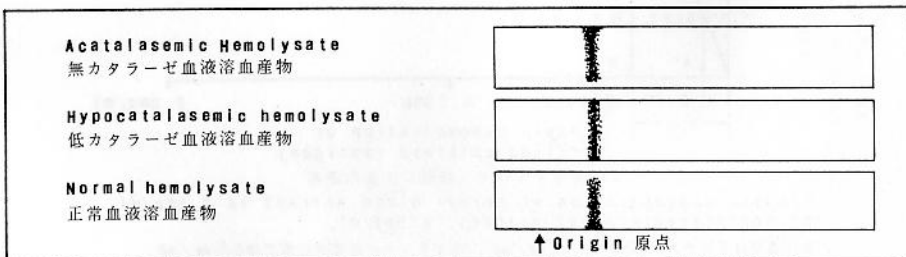


FIGURE 6 STARCH BLOCK ELECTROPHORESIS OF CRUDE CATALASE SOLUTION PURIFIED FROM NORMAL RED BLOOD CELLS

図6 正常血液から精製した粗カタラーゼ液の澱粉ブロック電気泳動像

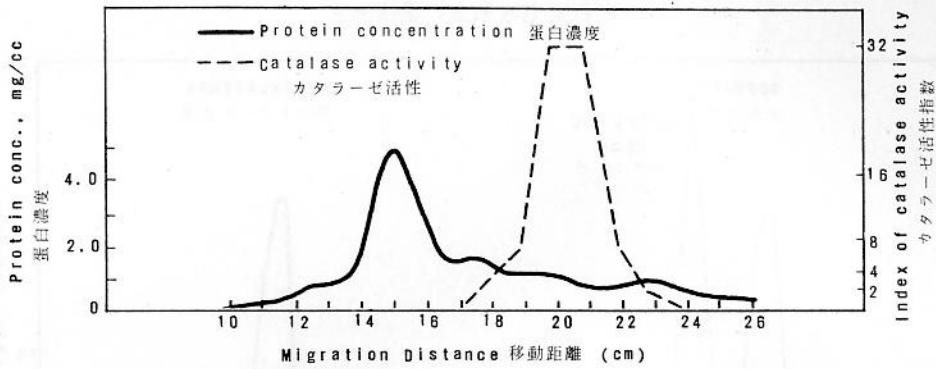
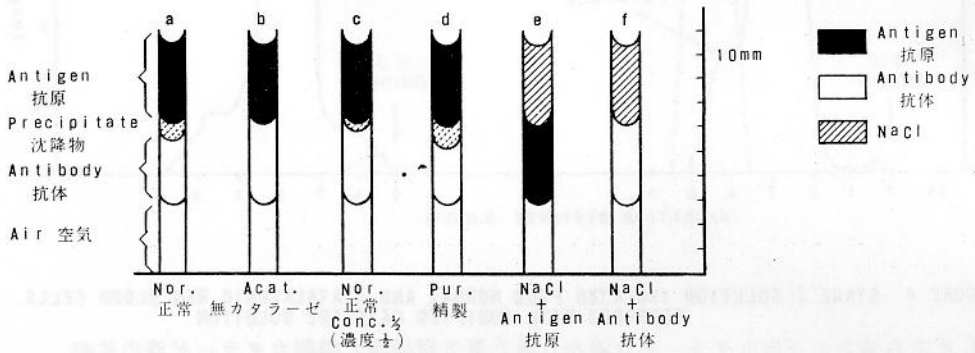


FIGURE 7 DIAGRAM OF MICROPRECIPITIN RING TESTS

図7 微量沈降輪環試験図

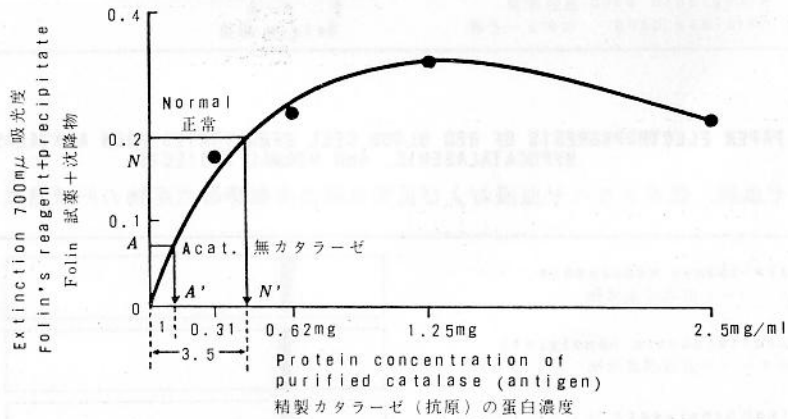


Tube a, positive reaction (catalase extract of normal erythrocytes and antibody); tube b, negative reaction (catalase extract of acatalasemic erythrocytes and antibody); tube c, normal antigens diluted 2 times, showing half as much precipitate; tube d, positive reaction (stage 5) of purified catalase and antibody; tubes e and f, controls.

試験管 a は陽性反応 (正常赤血球, カタラーゼ抽出液と抗体), b は陰性反応 (無カタラーゼ, 赤血球と抗体), c は正常抗原を 2 倍に希釈したもので, 沈降物は半分になっている, d は精製カタラーゼ (第 5 階梯液) と抗体が示す陽性反応, e および f は対照.

FIGURE 8 QUANTITATIVE PRECIPITIN CURVE SHOWING REACTION OF PURIFIED CATALASE WITH CATALASE ANTIBODY

図8 カタラーゼ抗体による精製カタラーゼの反応を示す定量沈降曲線



Protein concentration of normal blood extract is 2.2mg/ml; of acatalasemic blood extract, 4.5mg/ml.

蛋白濃度は正常血液抽出液では 2.2 mg/ml, 無カタラーゼ血液抽出液では 4.5 mg/ml.

tube b, on the other hand, is an illustration of the lack of precipitate when an extract of acatalasemic red blood cells is mixed with antibody. The protein concentration of the antigen used in tube a was the same as that of tube b.

When the antigen concentration obtained from crude catalase extract of normal erythrocytes is reduced to one-half that of tube a and mixed with antibody in tube c, a precipitate is still easily recognized.

There is exhibited in tube d distinct precipitation due to the reaction between purified catalase (stage 5, Herbert and Pinsent⁸) and catalase antibody. Tubes e and f contain antigen and antibody controls, and as anticipated there is no precipitate.

The quantitative curve of catalase reacting with anti-catalase rabbit serum is seen in Figure 8. The abscissa shows the antigen concentration and the ordinate indicates the extinction of the blue color produced by the addition of Folin's reagent to antigen-antibody precipitates. An average of 2 tests was made for each point on the curve. There was no significant difference between the results of the 2 determinations. Point N (Fig. 8) represents the precipitation due to the reaction between the crude catalase extract of normal erythrocytes and antibody; point A indicates the precipitation due to the meager reaction between acatalasemic erythrocyte extract and antibody.

The ratio of antigen concentration ($ON' : OA'$) calculated from the curve in Figure 8 proves to be 3.5:1. The protein concentration of the extract of acatalasemic blood was actually made 2 times the concentration of the normal blood extract in order to reveal any reaction between acatalasemic blood extract and antibody. This means that the real ratio of ON' to OA' is 7:1. The results of the quantitative precipitin tests coincide with those of the microprecipitin tests. This would

が作用してできた沈降物を明瞭に示し、他方試験管 b は無カタラーゼ血液から得た同様の抽出液と抗体を混合した場合沈降物が欠如することを示す。試験管 a で用いた抗原の蛋白濃度は試験管 b で用いたものと同じであった。

正常血液粗カタラーゼ抽出液の抗原濃度を試験管 a の半分に減じ、試験管 c で抗体と混合した場合でも、沈降物は依然として容易に認められる。

試験管 d では精製カタラーゼ液 (Herbert - Pinsent 法⁸ 第5階梯液) とカタラーゼ抗体間の作用によって生じた沈降物が明瞭に認められる。試験管 e および f は抗原および抗体に食塩水を添加して対照をとったもので、予期した通り沈降物は見られない。

図8は抗カタラーゼ家兔血清によるカタラーゼ反応の定量曲線を示す。横軸は抗原濃度、縦軸は Folin 試薬添加により抗原-抗体沈降物が発色した青色の吸光度を現わす。曲線上の各点ごとに2回テストを行なってその平均値を求めた。2つの測定値の間には有意の差は認められなかった。点N (図8) は正常赤血球粗カタラーゼ抽出液と抗体間の作用から生じた沈降物を現わし、点Aは無カタラーゼ赤血球抽出液と抗体間の微弱な作用によって生じた沈降物を現わす。

図8の曲線から計算した抗原濃度比率 (ON' 対 OA') は 3.5:1 である。実験では無カタラーゼ血液抽出液の蛋白濃度を正常血液抽出液の場合の2倍とし、無カタラーゼ血液抽出液と抗体間に現われる一切の作用がわかるようにした。従って、実験上の ON' 対 OA' 比率は 7:1 である。定量沈降反応の結果は微量沈降輪環試験の結果と符

indicate that the extract of acatalasemic blood seems to have only a trace of catalase protein if indeed any exists.

DISCUSSION

An attempt has been made to determine by paper electrophoresis and immunologic reactions whether or not catalase protein exists in the blood of subjects with acatalasemia. It was observed in our experiments that all catalase activity in fractions of normal blood was found in the eluate of a fast-moving electrophoretic peak of low magnitude (Fig. 3). In addition, the peak obtained by the use of purified catalase (stage 5) in Figure 2c has the same mobility as the faster peak of a stage 2 solution in Figure 2b.

In a partially purified catalase solution (Stage 2, Herbert and Pinsent⁸) from the blood of subjects with acatalasemia, a very faint peak having no catalase activity is seen. Two possibilities may be considered in order to explain this peak. If we assume the faster peak in normal blood consists of active catalase plus a second unidentified protein (Fig. 9), then in acatalasemic subjects the unidentified protein alone must remain in the blood. Since no catalase activity can be shown, this peak is possibly composed of proteins such as β -globulin, carbonic anhydrase,²² peptidase,²³ and/or methemoglobin reductase.²⁴ All of these proteins, and possibly others, have essentially the same mobility as the faint peak in acatalasemic blood. If, on the other hand, we accept the hypothesis that the faster peak consists solely of catalase, as in Fig. 9b, the faint peak of the acatalasemic blood could be composed of a genetically altered protein which is analogous to catalase. Of these 2 hypotheses, the former seems to be the more reasonable. The stage 2 extract of acatalasemic blood has been shown not to react with anti-catalase rabbit serum. The present electrophoretic study appears to support the previous study,²⁵ suggesting a

合する。このことは、無カタラーゼ血液に仮にカタラーゼ蛋白があるとしても、それは極めて微量に過ぎないことを示すものであろう。

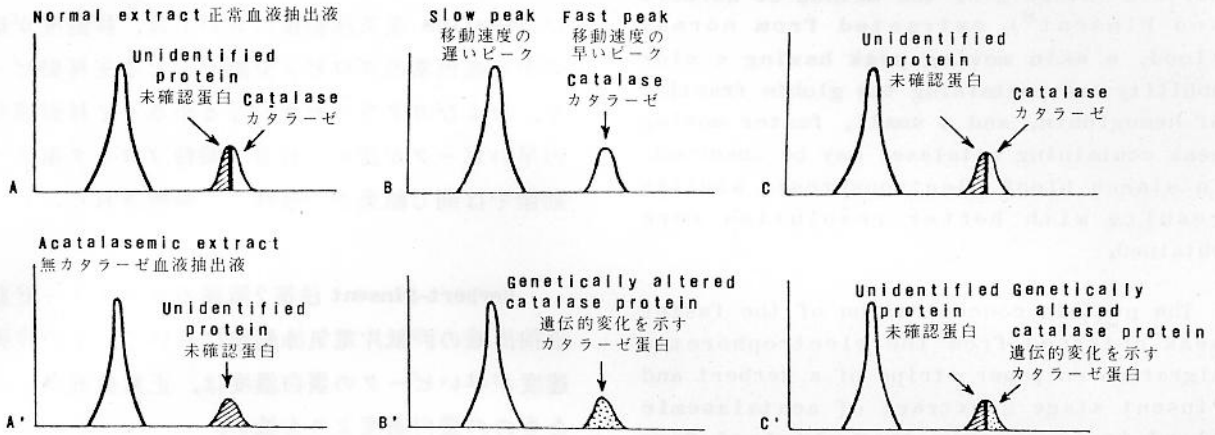
考 按

滷紙電気泳動法および免疫反応を利用して、無カタラーゼ血症者の血液内にカタラーゼ蛋白が存在するか否かの判定を試みた。電気泳動法においては、正常血液分画のカタラーゼ活性はすべて移動速度が早くてピークの低い電気泳動像を示す溶出液中に認められた(図3)。更に、図2Cにおける精製カタラーゼ液(第5階梯液)を用いて得たピークは、図2Bにおける第2階梯液における移動速度の早いピークと同じ移動度を示した。

無カタラーゼ血症者の血液から得た一部精製カタラーゼ液(Herbert-Pinsent法⁸第2階梯液)においては、カタラーゼ活性を持たない極めて微弱なピークが認められる。このピークについては二様の成立理由が考えられる。もし正常血液の移動速度の早いピークが活性を持つカタラーゼ並びに第2の未確認蛋白(図9)から成るものと仮定すれば、無カタラーゼ血症者においては未確認蛋白だけが血液中に残るはずである。カタラーゼ活性は証明されないのであるから、このピークは恐らく β -グロブリン、炭酸脱水酵素、²² ペプチダーゼ、²³ ないしはメトヘモグロビン還元酵素²⁴などの蛋白によって成立したものであろう。まだほかにもあろうが、これらの蛋白はすべて無カタラーゼ血液における微弱なピークと大体同じ移動度を持つ。他方図9Bに示す通り、もし移動速度の早いピークがカタラーゼだけから成るものと仮定すれば、無カタラーゼ血液に見られる微弱なピークは、遺伝的変化が行なわれたカタラーゼ類似の蛋白から成るといって差しつかえないであろう。これら2つの仮定の中では前者の方が合理的であると思われる。これまでのところ、無カタラーゼ血液第2階梯液には抗カタラーゼ家兔血清に対する反応が認められていないからである。今回の電気泳動法による研究の結果は前回の研究成果²⁵を

FIGURE 9 SCHEMA POSTULATED TO EXPLAIN THE FASTER COMPONENT IN ELECTROPHORETIC PATTERNS

図9 電気泳動像における移動速度の早い構成部の説明想定図



disturbed biosynthesis in which the catalase molecule is either absent, negligible, or altered to such an extent that it is no longer immunologically reactive.

The data presented above indicate that an extract of acatalasemic blood has almost no reactivity to catalase antibody. This may be rationalized by assuming either that the protein does not exist or, if present, it is so highly denatured as to possess no common determinant group.

These experiments have been carried out with an ethanol-chloroform extract, and there is a possibility that some denatured catalase may escape into the sediment. Because of this possibility immunologic reactions should be carried out between the hemolysate and human catalase antibody. These studies are currently being conducted.

SUMMARY

Studies on ethanol-chloroform extracts of erythrocytes of subjects with hereditary acatalasemia and normal red blood cells were performed by the use of paper, Tiselius, and starch block electrophoresis, microprecipitin ring tests, and quantitative precipitin studies.

裏付けるものであって、生合成障害が起り、そのカタラーゼ分子が消滅したか、無視してよいほどに減少したか、または免疫反応を示さないまでに変性したことを示唆している。

以上の諸資料は、無カタラーゼ血液抽出液がカタラーゼ抗体に対してほとんど無反応であることを示している。このことは、蛋白が全く存在しないか、たとえあっても共通の決定因子群を持たないまでに強く変性しているかのいずれかであると仮定して説明することができる。

これら実験はエタノール・クロロホルム抽出液を用いて実施したが、カタラーゼの中には変性して沈澱物中に失われて行ったものもあるであろう。このような可能性から考えて、更に溶血液と人間のカタラーゼ抗体の間に見られる免疫反応についても調べてみる必要がある。これらの研究は現在実施中である。

総括

遺伝性カタラーゼ血症者赤血球および健康者赤血球のエタノール・クロロホルム抽出液について、沱紙、Tiselius および澱粉ブロック電気泳動法、微量沈降輪環検査法、並びに定量沈降反応による研究を実施した。

In the paper electrophoretic and Tiselius electrophoretic patterns of catalase protein (stage 2 of the method of Herbert and Pinsent⁸) extracted from normal blood, a main moving peak having a slow mobility and containing the globin fraction of hemoglobin, and a small, faster moving peak containing catalase, may be observed. In starch block electrophoresis similar results with better resolution were obtained.

The protein concentration of the faster peak obtained from the electrophoretic migration on paper strips of a Herbert and Pinsent stage 2 extract of acatalasemic blood is lower than that obtained from normal blood.

Reaction between crude catalase solution (stage 2, Herbert and Pinsent⁸) from acatalasemic blood and catalase antibody is negligible as determined by the micro-precipitin ring test.

The concentration of catalase protein of stage 2 acatalasemic blood extract proves to be nearly zero, as calculated from the standard quantitative precipitin curve.

正常血液から得たカタラーゼ蛋白抽出液 (Herbert-Pinsent 法⁸ 第2階梯液) の滷紙および Tiselius 電気泳動像においては、移動度が緩やかで血色素のグロビン分画からなる主移動ピーク、およびカタラーゼからなる小さくて移動速度の早いピークが認められる。澱粉ブロック電気泳動像では同じ結果が一層詳しく解析された。

Herbert-Pinsent 法第2階梯の無カタラーゼ血液抽出液の滷紙片電気泳動像において、その移動速度が早いピークの蛋白濃度は、正常血液から得たものの蛋白濃度よりも低い。

無カタラーゼ血液から抽出した粗カタラーゼ液 (Herbert-Pinsent 法⁸ 第2階梯液) とカタラーゼ抗体の間の反応は、微量沈降輪環試験の成績に見られる通り無視して差支えない程度のものである。

第2階梯無カタラーゼ血液抽出液のカタラーゼ蛋白濃度は、基準定量沈降曲線から計算した結果が示す通り殆んど零に近い。

REFERENCES

参考文献

1. 高原滋夫, 宮本久雄: 家族的に見られたる歯性壊疽性顎骨炎の3例. 日本耳鼻咽喉科学会会報 51: 163-4, 1948年
(Takahara S, Miyamoto H: Three cases of progressive oral gangrene due to lack of catalase in blood. Nippon Jibi Inkoka Gakkai Kaiho-J Oto-rhino-laryng Soc Japan)
2. 高原滋夫: 無カタラーゼ血液症並びにこれによる新しい歯性口腔疾患について. 公衆衛生12: 18-19, 1952年
(Takahara S: A new odonto-oral disease due to acatalasemia. Koshu Eisei-J Publ Hlth)
3. Takahara S: Acatalasemia. 3. On the heredity of acatalasemia. Proc Japan Acad 28:10, 1952
(無カタラーゼ血症. 3. 無カタラーゼ血症の遺伝について)
4. 高原滋夫: 無カタラーゼ血液症並びに夫に因って来たと推える新疾患の提唱. 岡山医学会雑誌 63: 8-11, 1951年
(Takahara S: A new disease, probably due to lack of catalase in blood, "acatalasemia." Okayama Igakkai Zasshi-J of Okayama Med Soc)
5. 高原滋夫, 宮本久雄: 血液“カタラーゼ”欠乏によると思われる歯性進行性壊疽性顎骨炎の臨床的並びに実験的研究. 耳鼻咽喉科学会会報52: 2, 46, 1949; 耳鼻咽喉科臨床21: 53, 1949年
(Takahara S, Miyamoto H: Clinical and experimental studies on progressive oral gangrene due to lack of catalase in blood. Nippon Jibi Inkoka Gakkai Kaiho-J Oto-rhino-laryng Soc Japan; Jibi Inkoka Rinsho-Clin Oto-rhino-laryng)
6. Nishimura ET, Hamilton HB *et al*: Carrier state in human acatalasemia. Science 130: 333, 1959
(人間における無カタラーゼ血症の保因状態)
7. Takahara S, Hamilton HB *et al*: Carrier state in human acatalasemia. J Clin Invest 39:610, 1960
(人間における無カタラーゼ血症の保因状態)
8. Herbert T, Pinsent T: Crystalline human erythrocyte catalase. Biochem J 43:203, 1948
(結晶性人間赤血球カタラーゼ)
9. Grassmann W, Hannig K: In Paper Chromatography, ed by Kramer F. New York, St. Martins Press, 1954
(濾紙クロマトグラフィー)
10. Grassmann W, Hannig K, Kendel M: Über un Verfahren zur elektrophoretischen Bestimmung der Serumproteine auf Filtrierpapier. Deutsch Med Wschr 76:333, 1951
(血清蛋白の濾紙電気泳動測定法について)
11. von Holt C, Voigt KD, Gaede K: Papierelektrophorese von Eiwisskörpern bei erhöhter Spannung. Biochem Z 323:345, 1952
(高圧における蛋白質濾紙電気泳動法)
12. Longworth LG: Recent advances in the study of proteins by electrophoresis. Chem Rev 73:627, 1929
(電気泳動法蛋白研究における最近の進歩)
13. Kunkell HG: Zone electrophoresis. Meth Biochem Anal 1:141, 1954
(带状電気泳動法)

14. Folin O, Ciocalteu V: On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *J Biol Chem* 73:627, 1927
(蛋白質中のチロジンおよびトリプトファン定量について)
15. Euler HF, Josephson I: Catalase. *Ann Chem Liebigs* 452:158, 1927
(カタラーゼ)
16. Freund J, McDermott K: Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proc Soc Exp Biol Med* 49:548, 1942
(補助液による馬血清に対する感作)
17. Boyd WC: *Fundamentals of Immunology*, Ed 3. New York Interscience Publishers, Inc, 1956
(免疫学原理)
18. Heidelberger M, MacPherson CFC: Quantitative micro-estimation of antibodies in serum of man and other animals. *Science* 97:405, 1943
(人間その他の動物血清における抗原の微量定量法)
19. Heidelberger M, MacPherson CFC: Correction of Heidelberger and MacPherson.⁸ *Science* 98:62, 1943
(Heidelberger および MacPherson 法の修正)
20. Kabat EA, Mayer M: *Experimental Immunochemistry*. Springfield, Ill., Charles C Thomas, 1948
(実験免疫化学)
21. MacPherson CFC, Heidelberger M: Denatured egg albumin. 3. Quantitative immunochemical studies on crystalline egg albumin denatured in various ways. *J Amer Chem Soc* 67:585, 1945
(変性卵アルブミン. 3. 各種変性結晶性卵アルブミンの定量免疫学的研究)
22. Keilin D, Mann T: Carbonic anhydrase; purification and nature of the enzyme. *Biochem J* 34:1163, 1940
(炭酸脱水酵素: 酵素の精製とその性質)
23. Adams E, Smith EL: Peptidases of erythrocytes. 2. Isolation and properties of prolydase. *J Biol Chem* 198:671, 1952
(赤血球のペプチダーゼ. 2. プロリダーゼ分離およびその性状)
24. Huennekens FM, Liu L *et al*: Erythrocyte metabolism. 3. Oxidation of glucose. *J Biol Chem* 227:253, 1957
(赤血球代謝. 3. グルコース酸化)
25. Nishimura ET, Kobara TY *et al*: Immunologic evidence of catalase deficiency in human hereditary acatalasemia. *Lab Invest* 10:333, 1961
(人間の遺伝性の無カタラーゼ血症におけるカタラーゼ欠乏に関する免疫学的な証明)