Osaka University Knowledge Archive

Title	亜硝酸塩によるオキシヘモグロビンの酸化反応について
Author(s)	小坂, 博昭
Citation	大阪大学, 1982, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/33448
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

Osaka University

【65】

氏名・(本籍)	小坂博昭（こさかひろあき）
学位の種類	医学博士
学位記番号	第 5857 号
学位授与の日付	昭和57年12月21日
学位授与の要件	学位規則第5条第2項該当
学位論文題目	**亜硝酸塩によるオキシヘモグロビンの酸化反応について**
論文審査委員	(主査) 教授 中馬 一郎
	(副査) 教授 後藤 稠　教授 山野 俊雄

論文内容の要旨

〔目　的〕

亜硝酸塩（nitrite）は赤血球内のオキシヘモグロビン（HbO_2）をメトヘモグロビン（metHb）に酸化するのに使用されてきた。この酸化反応は遅延相の後に急速に進行することが知られている。更にHbO_2のallosteric effector である inositol hexaphosphate を加えると nitrite では酸化反応は抑制されるのに ferricyanide では，促進される。窒素酸化物の生体影響という点からもこの反応の機構を調べた。

〔方法ならびに成績〕

1）反応の stoichiometry とその機構

NO_2^-は反応経過中サンプリングして0℃の5％$HgCl_2$で除蛋白のちジアゾ化し芳香族化合物とカップリングさせて定量した。NO_3^-はオリオン社の硝酸イオン電極で連続測定した。酸素はガルバニ電極で測定した。その結果は次式で示される。

$$4\,HbO_2 + 4NO_2^- + 4H^+ \rightarrow 4\,metHb + 4NO_3^- + O_2 + 2H_2O$$

NO_2^-もNO_3^-も反応進行中 heme の変化と1：1に変化した。O_2もheme の変化量の$\frac{1}{4}$量発生する。これだけでは反応機構を推定できないので電子スピン共鳴（ESR）で測定してみた。

予期に反し NOHb は検出されなかった。ところが幅18ガウスでg値2.005 のHb由来だろうと思われる radical が反応進行中出現した。次に superoxide dismutase を加えてみたが，反応は修飾をうけなかったので superoxide anion（O_2^-）の発生は否定される。一方 catalase は反応を遅延させたのでH_2O_2が発生して反応に寄与していることは明らかである。KCN を添加しても反応の遅延は著

しい。KCNは metHb に強く結合するのでこの反応は自己触媒反応と考えられる。他に考えうる反応種として$OH^{\cdot}$ があげうるが，これの savenger を加えても反応は修飾をうけなかった。以上よりNO_2^-がHbO_2上のO_2を還元することにより，H_2O_2が発生してH_2O_2が met Hb と，反応を促進する complex を形成すると考えられる。事実ESRで検出された radical は metHb とH_2O_2を反応させて生じる metHb-radical と同じであった。metHb がH_2O_2存在下 oxidase 作用を発揮してNO_2^-もその基質となるとの報文があり，1電子酸化をうけて$NO_2\cdot$となると思われる。$NO_2\cdot$がHbO_2を酸化して急速に反応が進行すると考えられる。以上が反応機構のあらましである。今までの実験は全てリン酸緩衝液中での結果である。

2）bis-tris 緩衝液中での酸化反応

bis-tris 緩衝液中では反応の進行は非常に遅くなりESRで検出される metHb-radical の量も非常に減少する。又 superoxide dismutase の添加により初期相は延長するが自己触媒相の速度は促進される。これらをどの様に解釈したらよいか。bis-tris がmetHb-radical と反応して，bis-tris radical が出来，bis-tris radical がO_2に電子を与えO_2^-が生成したと考えるのが妥当であろう。metHb とH_2O_2は分光でperoxide compound と呼ばれる複合体を作ることが知られているので，上の仮説を実証する為にbis-tris 中でこれを観察した。bis-tris 中ではこの compound の生成は低下するが superoxide dismutase を加えると増加する。superoxide dismutase の添加で初期相が延長し自己触媒相の速度が促進するのはH_2O_2量が増加した為と思われる。これはbis-tris radical (X) とO_2^-が次式に示すように平衡を保っていると考えることで説明される。

$$X^{\cdot} + O_2 \rightleftharpoons X^+ + O_2^-$$

superoxide dismutase の添加で平衡は右にずれ$X^{\cdot}$の濃度は減少し，H_2O_2の生成がふえる。

3）lnositol hexaphosphate の添加の影響

lnositol hexaphosphate 添加でHbはほぼT状態をとることが知られている。ferricyanide は酸化剤，nitrite は還元剤としてHbO_2に作用する。lnositol hexaphosphate 添加でほぼT状態となったHbO_2はより酸化されやすくなり還元されにくくなったと考えられる。その結果ferricyanide では反応は促進し nitrite では反応は抑制されたと言える。

〔総　括〕

1．nitrite はHbO_2を還元しH_2O_2が生じた。

H_2O_2はmetHb と complex を作りこれの oxidase 作用により$NO_2^{\cdot}$が生成しHbO_2の酸化が進み自己触媒相を形成する。

2．bis-tris 緩衝液中ではbis-tris がcomplex をつぶし生じたbis-tris radicalとO_2の反応でO_2^-が生成する。

3．lnositol hexaphosphate はHbO_2をより環元されにくくするのでnitritによる反応は抑制された。

論文の審査結果の要旨

本研究は亜硝酸塩によるオキシヘモグロビンの酸化反応について初めて stoichiometry を経時的に求め次に各素反応の仮説を提出したものである。反応中フリーラジカルが出現すること及びそれを同定した最初の報告である。またO_2^-が本質的には本反応に関与していないことを明確にする事に成功している。またイノシトール-6-リン酸が本反応を阻害することを示した。上記のように本研究はオキシヘモグロビンの亜硝酸による酸化反応の機序を理解する為に，重要な寄与をなすものであり医学の進歩に貢献するところすくなくないものと認める。