

修飾型ヘモグロビンの大気汚染による生体指標としての意義

Significance of modified hemoglobins as a biological indicator for the air pollution effects on human body

代表研究者 金沢大学医学部生化学助教授 友田 燐 夫
Assoc. Prof., School of Medicine, Kanazawa Univ.
Akio TOMODA

協同研究者 日本医科大学衛生学教授 南 正 康
Prof., Nippon Medical School
Masayasu MINAMI

金沢大学医学部生化学講師 滝 沢 剛 則
Lecturer, School of Medicine, Kanazawa Univ.
Takenori TAKIZAWA

We analyzed the hemoglobin patterns of erythrocytes of workers handling aromatic compounds in a chemical plant on isoelectric focusing electrophoresis. We found that the oxidized hemoglobins such as half-oxidized hemoglobin ($\alpha^{2+}\beta^{3+}$)₂ and ($\alpha^{3+}\beta^{2+}$)₂ were significantly increased in the erythrocytes. Unexpectedly, the unusual anodic hemoglobins such as hemoglobin X and hemoglobin Y were accumulated to a great extent in these erythrocytes. The electrophoretic position of hemoglobin X was in good accordance with hemoglobin X produced by modification of oxyhemoglobin with copper. The electrophoretic position of hemoglobin Y was in between hemoglobin X and A, and we named it hemoglobin Y because there are no reports on this hemoglobin. The characterization of these hemoglobins X and Y is not sufficiently undertaken. The hemoglobin analysis of a worker showed: hemoglobin X, 6.2%; hemoglobin Y, 26.8%; hemoglobin A + hemoglobin F, 54.5%; half-oxidized hemoglobins, 9.8%; methemoglobin, 1.5%; hemoglobin A₂, 2%. Since the contents of hemoglobin A decreased by more than 40% of normal levels, and those of oxidized and modified hemoglobins increased up to 40% of total hemoglobins in the erythrocytes of several workers in the plant, we may take these cases for toxic methemoglobinemia with oxidized and modified hemoglobins caused by chemical compounds absorbed from skin and lungs. Therefore, these hemoglobins may be a good biological indicator to monitor the health of workers in chemical plants and of residents in the area of severe air pollution.

We had opportunity to analyze the changes in oxidized hemoglobins and modified hemoglobins in the bloods of a man who drank cresol solution to commit suicide. After having drunk cresol solution, he manifested a typical toxic methemoglobinemia. During four days rest on bed before blood transfusion, his bloods showed increased but fluctuated levels of half-oxidized hemoglobins, methemoglobin and anodic hemoglobin that is in good agreement with hemoglobin Y in terms of electrophoretic mobility. After blood transfusion, the levels of these hemoglobins decreased extensively, and his conditions were restored.

We studied whether aromatic compounds such as aminophenols and cresol oxidize and modify intracellular hemoglobin in human erythrocytes. Consequently, it was found that many aromatic compounds have a capacity of oxidizing human hemoglobin, and some of them caused the modification of hemoglobin.

Our findings suggests that the increase in oxidized and modified hemoglobins in the bloods reflects the accumulation of aromatic chemical compounds in bloods and body.

化学薬品工場の労働者の血液を採取し、赤血球中のヘモグロビンの組成を平板ゲル等電点電気泳動法を用いて詳しく分析した。その結果、これらの労働者の多くは対照の正常人に比べて酸化型ヘモグロビンが有意に増加していた。特に半分酸化型ヘモグロビンである $(\alpha^3+\beta^2)_2$ 、 $(\alpha^2+\beta^3)_2$ が著しく増加していた。また、正常人では通常存在しない修飾型ヘモグロビンであるヘモグロビン X およびヘモグロビン Y が赤血球中に高濃度に出現していた。これらの化学工場ではアミノフェノール等の芳香族化合物を生産しているので、これらの化合物が粉塵として経皮的あるいは肺呼吸を通して体内へ吸収されたことが考えられ、薬物の体内への蓄積と酸化型ヘモグロビンおよび修飾型ヘモグロビンの出現の強い相関性が疑われた。

一方、クレゾール溶液を飲んでメトヘモグロビン血症を引き起こした患者が救急センターに運ばれたので、その患者について治療の経過を追って血液を採取し赤血球内ヘモグロビンの分析を行った。その結果、クレゾールを飲んで数時間後には、酸化型ヘモグロビンであるメトヘモグロビンが高濃度に赤血球に蓄積しており、さらには修飾型ヘモグロビンであるメトヘモグロビン Y が高濃度に蓄積していることも明らかになった。これらのヘモグロビンの出現は血液中に吸収されたクレゾールによって引き起こされたことも、血液中のクレゾールを定量することで説明できた。この患者の容態は交換輸血を行うことにより改善したが、これは酸化型ヘモグロビン及び修飾型ヘモグロビンの消失によるものであると考えられる。

このように化学工場の労働者及びクレゾールを飲んだ患者の赤血球には有意に酸化型ヘモグロビンと修飾型ヘモグロビンが蓄積していることが明らかになった。このことは赤血球中のヘモグロビンを分析することにより血液中の種々の薬物の蓄積を容易に推定できることを示唆しており、酸化型ヘモグロビンおよび修飾型ヘモグロビンが大気汚染や薬物取り扱いによる各種薬物の生体内汚染の指標として利用できることを裏づけている。

私達はさらにアミノフェノール類やクレゾールなどの芳香族化合物の赤血球内ヘモグロビンへの作用を試験管内実験で検討した。その結果、アミノフェノール等の芳香族化合物の多くは赤血球内のヘモグロビンを酸化し、半分酸化型ヘモグロビン及びメトヘモグロビンへ変化させることが、明らかになった。また、これらの化合物のなかでホモゲンチジン酸はヘモグロビンを酸化させる作用をもっているが同時にヘモグロビン X を直接生成させる作用があることを示された。しかしながら、クレゾールについてはそのような作用は見いだせなかったため、生体内に吸収されると活性型の物質に変化したのちにヘモグロビンの酸化や修飾を行うであろうことが示唆された。

はじめに

化学薬品を製造する工場の労働者は芳香族化合物を体内に吸収する可能性が多く、以前は時々メトヘモグロビン血症を起こした症例が報告されていた。しかしながら近年では労働環境も改善され、しかも直接薬物を取り扱う労働者は防塵マスクおよびゴムコートを装着しているため、重篤なメトヘモグロビン血症が起きることは少なくなった。それにもかかわらず十分防備した化学薬品取り扱い現場の労働者の循環血液中の赤血球内ヘモグロビンの組成を分析したところ、酸化型ヘモグロビンである半分酸化型ヘモグロビンおよびメトヘモグロビンが有意に増加していることを見いだした。そこで、我々はこのような化学薬品製造工場とくに芳香族化合物製造工場の労働者について平板ゲル等電点電気泳動法により血液内のヘモグロビンの組成を詳しく分析した。

その結果、これらの労働者の赤血球内には酸化型ヘモグロビンの増加が著しいことが示されたが、同時に正常人では通常存在しない修飾型ヘモグロビン（ヘモグロビン X およびヘモグロビン Y）がかなりの濃度に存在することが見いだされた。これらの酸化型ヘモグロビンおよび修飾型ヘモグロビンの出現は取り扱い薬物と相関性があると考えられるのでその因果関係を明らかにするた

めに、化学工場の製造薬品を中心に赤血球内ヘモグロビンへの作用を試験管内で検討した。

またこの研究遂行中に芳香族化合物の一種であるクレゾールを飲んだ患者が救急センターに運びこまれ、その経過を調べる機会をえた。この患者は典型的なメトヘモグロビン血症を起こしていたが、血液を分析すると赤血球内にメトヘモグロビンはもちろん、それ以外に修飾型ヘモグロビンであるヘモグロビン Y が大量に蓄積していた。これら酸化型ヘモグロビンおよび修飾型ヘモグロビンの変動および血液中クレゾール濃度の変化についてこの患者の経過を追って分析した。この症例からクレゾールの血液内蓄積により赤血球内ヘモグロビンが酸化あるいは修飾されることがヒトのレベルで初めて明らかになった。

以上の研究結果から、酸化型および修飾型ヘモグロビンの濃度の測定が種々の薬物の生体内汚染の指標となることが示唆されたので、その意義について検討したい。

実験方法

1. 芳香族化合物製造工場の労働者の赤血球内ヘモグロビンの分析

芳香族化合物の製造を主としておこなっている某化学工場労働者数十名について本人の同意を得

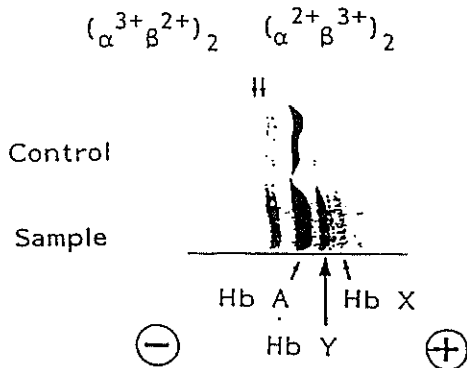


図1. 平面ゲル等電点電気泳動法によるヘモグロビンの分析; control は正常成人の血液サンプル, sample は化学工場労働者で半分酸化型ヘモグロビン及び修飾型ヘモグロビンの増加が著しい血液サンプルを示す。

たのち採血を行った。血液はヘパリン採血で行った。この工場では主にパラニトロフェノール、オルトニトロフェノールなどの芳香族ニトロ化合物、4-クロロ-2-アミノフェノールなどのクロロフェノール化合物を製造している。これらの化合物の製造現場では防塵マスクおよび防塵ゴムコートの装着が義務付けられている。ただし、目の周囲の皮膚のみ防御されていない。採血された血液0.1mlを5mlの蒸留水に加え溶血した後COガスを吸入してよくかき混ぜる。この溶血液について平板ゲル等電点電気泳動を行いヘモグロビンの分析を行った。平板ゲルはファルマシア・LKB社(pH 3.5~9.5)のものをを用いた。泳動終了後、固定液で処理して、種々のヘモグロビンの分析を行った¹⁾。

2. 種々の芳香族化合物によるヘモグロビンの酸化および修飾反応の解析

正常成人より得た血液を凍結融解を繰り返して溶血し実験試料とした。この溶血液に種々の芳香族化合物(ホモゲンチジン酸, ナフトキノ-4-スルホン酸, 2-アミノ-4-クロロフェノール, サリチルアルコール, o-アミノフェノール, m-アミノフェノール, p-ニトロフェノール)および硫酸銅を含む溶液を加え(最終濃度; 1 mM), 10時間反応させた。この試料について等電点電気泳動を行いヘモグロビンの分析を行った。

3. クレゾール溶液を飲んでメトヘモグロビン血症を起こした患者の血液の分析

50歳の男性が自殺目的でクレゾール溶液を飲んで2時間後に救急センターに運びこまれた。この時、この男性は意識不明の状態であり、典型的なチアノーゼとメトヘモグロビン血症を呈していた。そこで、私達は担当の医師と連絡を取り合いながら血液中のクレゾール、フェノール濃度および赤血球内ヘモグロビンの組成の分析を経時的に行った。この患者は来院時には、血圧が90から136 mmHgの間を変動し、脈拍は101/minであり、対光反射は低下しており、尿の色は暗褐色であった。メトヘモグロビンの濃度は入院15時間後に急激に増加したので、その時点で交換輸血を行った。その結果、この患者のチアノーゼは改善

表 1. 正常成人および化学工場労働者の赤血球内ヘモグロビンの組成分析

	Hb X	Hb Y	Hb A + F	Half-oxidized Hb	metHb	Hb A ₂
Control	1	1	94.0	1.5	0	2.5
A	1.0	5.2	85.2	4.8	1.8	2.0
B	1.5	9.0	74.1	11.0	2.1	2.3
C	2.2	14.5	72.4	8.2	1.5	1.2
D	3.1	24.4	56.9	12.1	2.0	1.5
E	6.2	26.8	54.5	9.8	1.5	2.0

数値は全ヘモグロビン量に対する各ヘモグロビンの割合 (%) を示す。A~E は化学工場労働者の典型例を、control は正常成人を示す。

し、容体も急回復した。

結果と考察

私達は化学薬品製造工場の現場労働者数十名について採血を行い、赤血球中のヘモグロビンの組成を分析した。図 1 に平板ゲル等電点電気泳動でヘモグロビンの組成を調べた結果の一例を示す。その結果、この労働者の赤血球には通常存在するオキシヘモグロビン (Hb A) 以外に酸化型ヘモグロビンである ($\alpha^3+\beta^2$)₂, ($\alpha^2+\beta^3$)₂, メトヘモグロビンがかなり存在していることが明らかになった。また Hb A より陽極側に二つのヘモグロビンが出現していることがわかる。これら二つのヘモグロビンはその泳動位置から一つはヘモグロビン X (このヘモグロビンは銅イオンとヘモグロビンが反応すると形成されることが示されているが²⁾, 未だその化学的性質が明らかでない) のように名づけられている。), もう一つはヘモグロビン Y (このヘモグロビンは我々がこの研究で初めて見つけたものであり、かりにヘモグロビン Y と名づけた。) であることがわかったので、ここではこれらのヘモグロビンを修飾型ヘモグロビンとして取り扱う。

表 1 はこの工場の労働者のうち、かなり激しい酸化型ヘモグロビンおよび修飾型ヘモグロビンの増加例を示す。例えばある例ではヘモグロビン X は 6.2%, ヘモグロビン Y は 26.8%, ヘモグロビン A + F は 54.5%, 半分酸化型ヘモグロビンは 9.8%, メトヘモグロビンは 1.5%, ヘモグロビン A₂ は 2% であった。正常成人ではヘモグロビン A + F が 94% 以上を占めることから考えてもこ

の例では修飾型ヘモグロビン及び半分酸化型ヘモグロビンがいかに蓄積して、またヘモグロビン A が低下しているかわかる。この場合、修飾型ヘモグロビンおよび酸化型ヘモグロビンはヘモグロビン A に由来していると考えられる。それ故この症例は軽症のメトヘモグロビン血症および高度の修飾型ヘモグロビン血症と考えるとよいといえる。このような例はこの工場の労働者でかなりの数にみられたが、いずれの場合も病的な自覚症状はないので、こういう状態に生体が順応していると思われる。しかしながら、このように赤血球内に酸化型ヘモグロビンおよび修飾型ヘモグロビンが著しく増加していることは、裏をかえせば血液中に化学物質、特にこの工場生産されている芳香族化合物が存在していることを示しており問題を含んでいる。このような症例は他の類似の化学工場労働者についても起きていることが十分考えられ、また化学物質で大気が汚染されている地域の住民についても同様のことがいえるので、今後詳しく調査をすすめてゆきたい。ところで糖尿病の患者では血液内に大量のグルコースが蓄積していることがよく知られている。このグルコースは赤血球のヘモグロビンを修飾しヘモグロビン A1c を形成するが、このヘモグロビン A1c が糖尿病患者の治療の目安になっており、血液内のグルコース濃度の指標として臨床的によく使用される。今回私達が明らかにしたヘモグロビン X およびヘモグロビン Y は同様な意味で薬物の血液内濃度の指標として考えて良い。

次にどういう芳香族化合物がヘモグロビンを酸

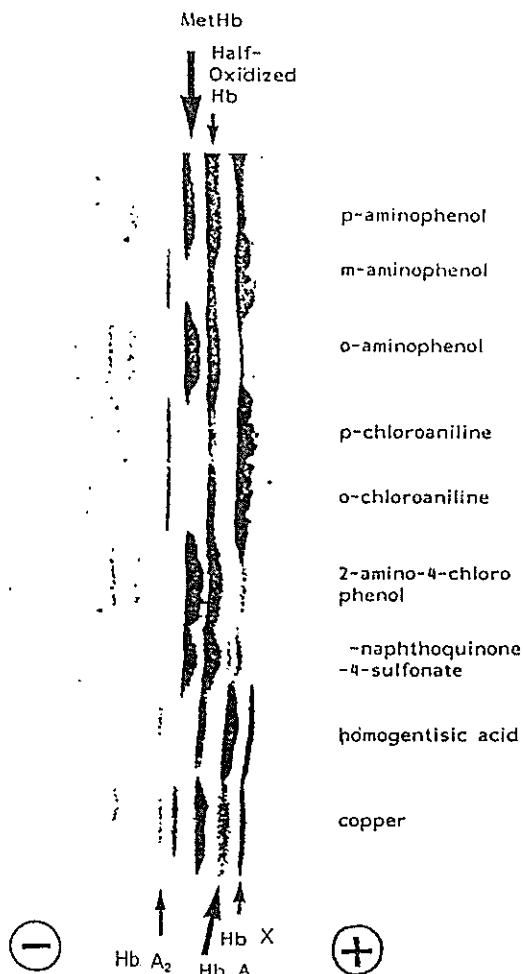


図2. 種々の芳香族化合物と銅イオンを加えたヘモグロビン溶液における酸化型ヘモグロビンおよび修飾型ヘモグロビンの生成

化し、あるいは修飾するかを試験管内実験で確かめた。図2は正常成人の血液より得たヘモグロビン溶液に種々の芳香族化合物を加えて反応させて得られる試料を平板ゲル等電電気泳動で分析した結果を示している。その結果実験に用いた芳香族化合物すべてについてヘモグロビンを強力に酸化する作用があることが明らかになった。ただし、修飾型ヘモグロビンの生成能についてはいずれも直接的な作用は小さく唯一ホモゲンチジン酸が強力な作用を持っていることが証明された。ホモゲンチジン酸存在下ではヘモグロビンは酸化さ

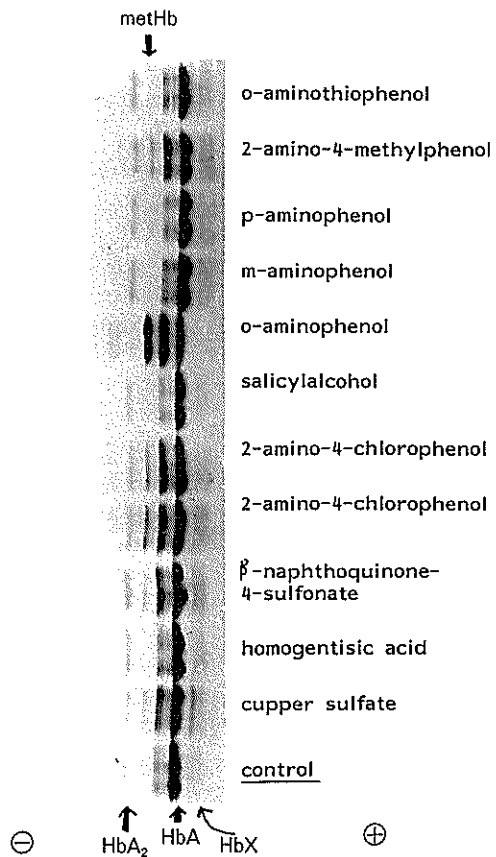


図3. 種々の芳香族化合物と銅イオンを加えた赤血球浮遊液における酸化型ヘモグロビンおよび修飾型ヘモグロビンの生成

れると共に修飾も受けヘモグロビン X に変化した。このようなヘモグロビンの変化は銅イオン存在下でも起きることが報告されている²⁾。ところが、赤血球浮遊液にこれらの化合物を加えたところ 2-アミノ-4-クロロフェノール、*p*-ニトロフェノール、サリチルアルコール、*m*-アミノフェノールが中等度に修飾型ヘモグロビンを生成させ、銅イオンおよびホモゲンチジン酸がかなり修飾型ヘモグロビンを生成させた(図3)。これらの化合物はすべて赤血球内ヘモグロビンの酸化作用が強力であった。以上の結果はこれら芳香族化合物が生体内に吸収され血液内に入ると赤血球のヘモグロビンを酸化及び修飾することを示しており、前述の工場労働者の赤血球ヘモグロビンの酸化及び修

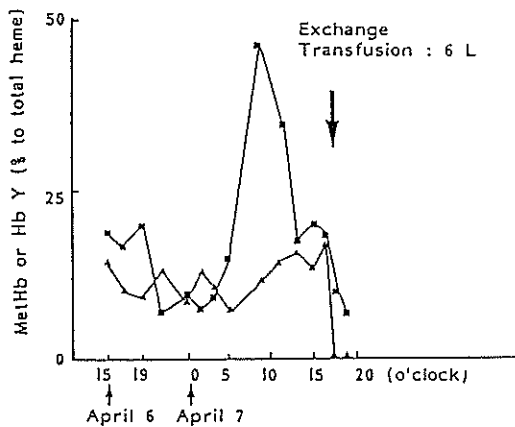


図4. クレゾールを飲んだメトヘモグロビン血症患者の治療過程における赤血球内メトヘモグロビン及びヘモグロビンYの変動. ▲: ヘモグロビンY, ■: はメトヘモグロビンを示す.

飾を十分説明できるといえる。修飾型ヘモグロビンが血液内でどのようなメカニズムで生成されるかについてはヘモグロビンXおよびヘモグロビンYの化学的性質が未だ明らかでないので今後の研究に待たれる。

次にこの研究遂行中にヘモグロビンYが異常に増加した稀な症例に遭遇したので以下述べる。この患者は自殺目的でクレゾール溶液を飲んで意識不明になったところを発見され救急センターに運ばれた。その当時高度のチアノーゼがありクレゾール臭がつよくメトヘモグロビン血症を起こしていた。治療に際してこの患者より一定時間ごとに血液を採取し血液中のクレゾール及びヘモグロビンの組成を分析した。その結果クレゾールは時間の経過と共に血液中より減少していったが(図には示さず), ヘモグロビンはメトヘモグロビンに変化していることが平板ゲル等電点電気泳動による分析で明らかになった(図4)。また, この場合修飾型ヘモグロビンであるヘモグロビンYが異常に高い濃度で赤血球内に存在することが見いだされた。この患者は入院2日目に血液メトヘモグロビンが突然著しく増加したので経過を見ながら交換輸血を受けた。その結果血液中よりメトヘモグロビンおよびヘモグロビンYが消失し症状は改善した。そこでこのようなメトヘモグロビン

および修飾型ヘモグロビンの増加がクレゾールの直接作用によるものかどうかを正常成人より得た赤血球にクレゾール溶液を加えて調べた。しかしながらクレゾールを赤血球に直接与えても赤血球内ヘモグロビンは変化しなかった(データは示さず)。この結果クレゾールが患者の生体内に吸収された後, 肝臓で何か活性型の化合物に変化した後, 赤血球細胞に入りヘモグロビンを酸化および修飾したことを示唆している。図4に示した患者の治療経過で入院2日目に突然メトヘモグロビンが増加したことはこの時期にクレゾールの活性型代謝物質が大量血液中に蓄積していることを示唆している。この物質が何であったかは不明であるが動物を用いた実験で解明されるであろう。いずれにせよ, クレゾールのような芳香族化合物が生体内に吸収されるとメトヘモグロビン血症およびヘモグロビンY血症を引き起こすことが初めて明らかになった。

おわりに

本研究の目的は大規模な地域的大気汚染や化学物質製造工場現場の化学物質粉塵汚染による生体への影響をヘモグロビンという赤血球に特異的に存在する蛋白質を指標にして検討することである。その目的の一部は前述のとおりヘモグロビンが良い指標となることが明らかになり, 達成されたといえる。しかしながら, 防塵に十分注意を払っている工場でこのようなメトヘモグロビン血症および修飾型ヘモグロビン血症が起きていることは, 今後地球環境がますます悪くなると考えられる現在, 我々にさまざまなおおきな問題を提示している。

この問題の早急な解決を強く感じながらこのレポートの終わりとしていたい。

文 献

- 1) Tomoda, A., Imoto, M., Hirano, M., and Yoneyama Y.: *Biochem. J.*, 181, 505-507 (1979).
- 2) Carrell, R. W., Krishnamoorthy, R., and Winterbourn, C. C.: in *Biochemical and Clinical Aspects of Haemoglobin Abnormalities*, ed. by W. S. Caughey, Academic Press, New York, 1978, pp. 583-589.