

健康人の赤血球中 2, 3 DPGについて

佐二木 順子* 福田 芳生* 福島 悦子*
 平井 愛山** 原田 哲志**

Studies on 2,3 DPG Contents in Erythrocyte in Healthy People

Junko SAJIKI, Yoshio FUKUDA, Etsuko FUKUSHIMA,
 Aizan HIRAI and Tetsushi HARADA

I はじめに

2, 3 Diphosphoglyceric acid (2, 3 DPG)は赤血球における Embden-Meyerhof 解糖系の副路である Rapoport-Luebering cycle を形成する赤血球解糖中間

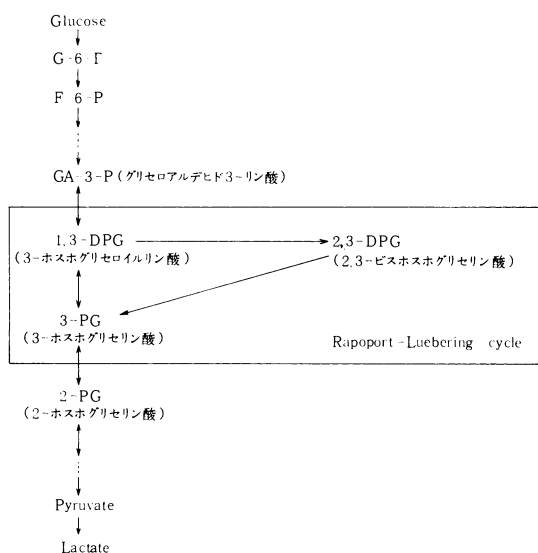


図1 赤血球解糖系

体である(図1)。2, 3DPGは赤血球内可溶性有機磷の50%以上を占め、その濃度は5.0mM前後にも達する。この濃度は他の細胞の100倍以上である。この2,3DPGはO₂の運搬上、重要な役割を果たしている。すなわち、ヘモグロビンの酸素親和性が大部分赤血球中の2,3DPGの濃度により規制されており、2,3DPGが増加すると酸素親和性が低下し、減少すると高まる。例えば、高い山に登った場合とか、貧血、心・肺疾患などで低酸素血症という状態におかれた場合、生体は2,3DPG増加という形で対応する。

又、最近糖尿病をはじめとする各種疾患で低値を示すという報告¹⁾²⁾がなされており、今後、一般住民検診等において、貧血をはじめ、各種成人病、赤血球における遺伝性疾患等をスクリーニングする上で重要な指標になりうるものと思われる。

ところが、これまで2,3DPGの測定はマスキングに対応できる状態ではなかったが、最近、我々は自動化を試み、多検体処理できる見通しがついた³⁾。

そこで今回、その方法を利用し、オートアナライザーによって測定した一般住民の値を、性別、年齢別に示し、ヘマトクリット(Ht)値、血色素(Hb)値、赤血球数(RBC)との相関についても検討したので報告する。

II 材料ならびに方法

54年11月に実施された船橋地区の農家検診で採血した男87、女300、計387検体について測定を行なった。平均年齢は男52.3才、女50.2才である。

採血時直ちに1mlを0.6N過塩素酸5ml中に入れミキサーで十分混和し(約30秒)、低温保存の後、遠心分離(3000r.p.m, 10分)し、上清を2.5M K₂CO₃にて中和したものをを用い2,3DPG測定を行なった。

測定原理は表1に、又使用した反応試薬の組成は表2のとおりである。オートアナライザーの条件は、反応時間15分、反応温度33℃であり、本法における標準2,3DPG(Sigma社)の添加回収率は表3に示したとおりである。

2,3DPG測定と同時に、Ht値、Hb値、赤血球数についても測定を行なった。

データについての差の検定はすべてt検定で処理した。

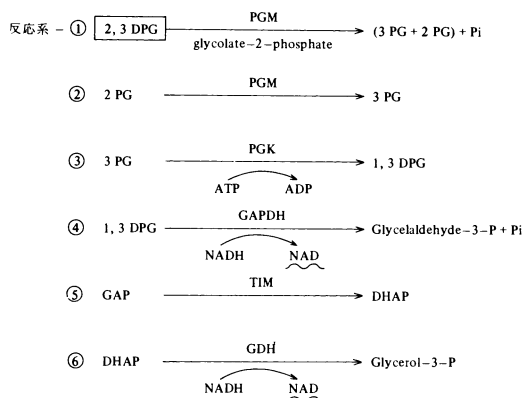
III 結果

赤血球中2,3DPGの性別、年齢別値を表4に示した。その結果、男4.80μmole/ml RBC、女5.15μmole/ml RBCと女性が高値であった。各年齢間の差については、女の41~45才と61才以上に5%水準で有意差が認められた。

* 千葉県衛生研究所
 ** 国立柏病院
 (1980年3月19日受理)

表 1 2, 3 DPGの自動分析法

測定原理



* 1 モルの 2, 3 DPG で 2 モルの NAD が生成される

表 2 反応試薬の組成

I. 反応試薬 - A

Sample Blank 用

反応系 ② ~ ⑥ からなる

Buffer

47 mM Triethanolamine PH 7.6
5.1 mM EDTA
5.2 mM MgCl₂

Enzyme

反応系 - ② 0.35 U* PGM
③ 23.4 U PGK
④ 0.35 U GAPDH
⑤ 12.5 U TIM
⑥ 3.2 U GDH

Substrate

1 mM ATP
0.24 mM NADH

II 反応試薬 - B

Sample Assay 用

反応系 ① ~ ⑥ からなる

Buffer

47 mM Triethanolamine PH 7.6
5.1 mM EDAT
5.2 mM MgCl₂

Enzyme

反応系 - ① 8.8 U PGM
反応系 - ② } 反応試薬 A に同じ
③ }
④ }
⑤ }
⑥ }
反応系 - ⑥ }

Substrate

1 mM ATP
0.48 mM G2P
0.24 mM NADH *U : U/ml の略

表 3 自動分析による 2.3DPG の添加回収実験

* 添加 2.3DPG	a(O.D)	b(O.D)	a-b	s	% 回収率
1 0mM	-	0.098	-	-	-
2 1 mM	0.134		0.036	0.044	81.8
3 2 mM	0.170		0.072	0.088	81.8
4 2.5 mM	0.189		0.091	0.110	82.7
5 4 mM	0.250		0.152	0.176	80.4
6 5 mM	0.281		0.183	0.220	83.2
7 7.5 mM	0.385		0.287	0.330	82.0
8 10 mM	0.480		0.382	0.444	86.0

添加 回収率(平均値) 83.4%

* Sample 100 μl に 2.3 DPG Standard solution 100 μ を添加して行った。

Ht 値と 2.3DPG との関係については表 5 に示したが、Ht 値が低いものでは 2.3DPG が有意に高かった。

次に、2.3DPG と他の項目 (Ht, Hb, 赤血球数) 間の相関係数を表 6 に示した。それによると、2.3DPG と Ht 値には 0.1% の危険率で負の相関が認められた。同様に Hb 値、赤血球数との間にもそれぞれ 0.1%、0.5% の危険

表 4 2.3DPG の性別、年齢別値

赤血球中の 2, 3 DPG (μmol/ml-RBC)

年齢	男 (No)	女 (No)
- 40	4.23 ± 0.52 (4)	5.05 ± 0.96 (12)
41 - 45	4.75 ± 0.69 (15)**	5.31 ± 0.58 (68)**[†]
46 - 50	4.93 ± 0.55 (22)*	5.23 ± 0.66 (74)*
51 - 55	4.73 ± 0.66 (17)†	5.10 ± 0.56 (77)†
56 - 60	4.82 ± 0.72 (14)	5.00 ± 0.45 (44)
61 -	5.02 ± 0.49 (15)	4.96 ± 0.57 (25)[†]
計	4.80 ± 0.61 (87)*	5.15 ± 0.61 (300)*

* : p < 0.001, ** : p < 0.01, † : p < 0.05, * : p < 0.10
() は女性間の比較

表 5 ヘマトクリット値と 2.3DPG との関係

ヘマトクリット (%)	数	2,3 DPG (μmol/ml-RBC)
26 - 30	5	6.11 ± 0.68*
31 - 35	22	5.72 ± 0.62*
36 - 40	150	5.18 ± 0.57*
41 - 45	157	5.01 ± 0.51*
46 - 50	46	4.61 ± 0.64*

(* : p < 0.001)

率で負の相関が認められた。

表6 2,3DPGと他項目との相関係数

Ht	0.466**
Hb	0.390**
赤血球数	0.238**

検体数 380

** P < 0.01

IV 考察

赤血球がその形態を維持し、細胞内外のイオン勾配を維持するためにはエネルギーが必要である。しかし、成熟赤血球はミトコンドリアを欠き、TCA回路が存在しないため、その供給は主としてEmbden - Meyerhof解糖系に依存している⁷⁾。そのなかで、最も含量の多い解糖中間体がこの2,3DPGであり、それは血球内Hb濃度とはほぼ一致しており、Hbの酸素親和性を調節している重要な因子として注目をあつめている。

これまで純化したHbと全血のHbとの間に約10倍もの酸素親和性のずれが存在することが謎とされていたが、2,3DPGがHbの酸素親和性を調節しているとううBeneschらの発見⁸⁾によりこの謎は解明された。

それ以来、貧血をはじめとする各種疾患と2,3DPGとの関連について研究が進められている。とくに貧血の場合では、一般に2,3DPGの濃度が上昇すると考えられているが、その原因については不明のことが多い。しかし、この2,3DPGの調節は、解糖系における3つの律速酵素(hexokinase, phosphofructokinase, pyruvate kinase)によってなされていると考えられている⁶⁾。とりわけpyruvate kinase/phosphofructokinase 活性比は2,3DPGをはじめとするDPG含量を左右している。このことは、先天的に赤血球のphosphofructokinase, pyruvate kinaseを欠損した病態に関する研究にもとづいている^{7,9)}。

今回の住民についての成績からも、2,3DPGと貧血との間には相関関係が認められた。今回の男・女Ht値は表7に示したとおりであり、全般にHt等の値が低く貧血傾向にある女性で、2,3DPGの高い事実は、今後の貧血のスクリーニングに2,3DPGが十分意義をもつものと考えられる。

ところで、ひと口に貧血といえども、その原因は様々であり、その原因により2,3DPGの値にも差があること

表7 性別、年齢別ヘマトクリット値

年齢	ヘマトクリット	
	男 (No)	女 (No)
- 40	49.5 ± 1.7 (4)*	38.6 ± 5.0 (12)*
41 - 45	45.9 ± 2.2 (15)*	39.3 ± 3.5 (68)*
46 - 50	45.8 ± 3.8 (22)*	39.1 ± 3.9 (74)*
51 - 55	45.1 ± 3.4 (17)*	40.1 ± 2.6 (77)*
56 - 60	43.6 ± 2.9 (14)**	40.8 ± 2.6 (44)**
61 -	43.9 ± 3.9 (15)**	39.8 ± 2.8 (25)**
計	45.2 ± 3.5 (87)*	39.7 ± 3.3 (300)*

* : p < 0.001, ** : p < 0.01

が報告されている。例えば、鉄欠乏性貧血患者の2,3DPGは再生不良性貧血、尿毒症による貧血より高値である⁹⁾。一方、特殊な貧血、たとえば、hexokinase欠損症では2,3DPGが著しく減少している。この様に2,3DPGの測定によってより詳細な情報がえられる。

また、我々が大きな課題としている様々な成人病との関係については、Valeriら¹⁰⁾はうっ血性心不全で2,3DPGが増加することを認め、横山ら¹¹⁾は組織のhypoxia(低酸素状態)の程度と2,3DPGの増加との間の関連性を示唆している。又、糖尿病性ケトアシドーシスの際、2,3DPGが減少することは明らかになっている¹²⁾。この2,3DPGの減少については、血中H⁺の増加により赤血球の解糖系のphosphofructokinaseの活性が阻害されるためであると考えられている⁷⁾。

この様に、血中Hbの酸素解離に影響を与える因子としては2,3DPGの他、CO₂, pH等があり¹³⁾、2,3DPGの変動の原因については、一元的に説明のつくものではない。しかしながら、今回の測定法の自動化の開発により、今後成人病等のスクリーニングに応用していく価値はあるものと考えている。ただ、コストの面からマススクリーニングにのせるには問題があるが、今後の改良等により可能になるものと期待される。

V まとめ

- (1) 血中ヘモグロビンの酸素解離上重要な調節因子と考えられている2,3DPGの測定を一般住民男87, 女300, 計387について行なった。
- (2) 2,3DPGの値は男4.80μmole/ml RBC, 女5.15μmole/ml RBCと女が高値を示した。
- (3) 2,3DPGとHt値, Hb値, 赤血球数との間には有意な負の相関関係が認められた。

- (4) 2.3DPG は貧血の場合、その値が増加することは明らかであり、スクリーニングの指標になりうることは言うまでもないが、その他血球の先天的な遺伝性疾患をはじめ、各種の成人病等のスクリーニングにも十分活用できることを強調した。

謝辞

今回のスクリーニングに御協力いただいた、船橋市役所健康管理課、農政課ならびに船橋保健所検査室の方々に謝意を表します。

文献

- 1) 桑島正道：アシドーシス・アルカローシスと 2.3DPG, クリニカ, 6, 444-456, 1979.
- 2) 岡田和夫：呼吸器疾患と 2.3DPG, クリニカ, 6, 430-438, 1979.
- 3) 平井愛山ほか：ヒト赤血球 2.3DPG の自動分析とその応用, 第17回日本臨床代謝学会総会, 1980(大阪).
- 4) 水上茂樹：続・糖代謝とその制御(血球), 蛋白質核酸酵素, 臨時増刊号, 220-224, 1979.
- 5) Benesch R., and Benesch R. E.: The effect of organic phosphate from the human erythrocyte on the allosteric properties of hemoglobin, Biochem. Biophys. Res. Commun., 26, 162-167, 1967.
- 6) Rapoport, S.: In Essays in Biochemistry. P. N. Campbell and G. D. Greville, Eds., Vol 4, 69-103, Academic Press. N. Y., 1968.
- 7) Tarui, S., et al.: Enzymatic basis for the coexistence of myopathy and hemolytic disease in inherited muscle phosphofructokinase deficiency, Biochem. Biophys. Res. Commun., 34, 77-83, 1969.
- 8) Waller, H. D. and Benöhr, H. C.: In Cellular and Molecular Biology of Erythrocytes. H. Yoshikawa and S. M. Rapoport, Eds pp. 377-407, Univ. Tokyo Press. 1974.
- 9) 織田進, 三輪史朗：貧血と 2.3DPG, クリニカ, 6, 439-443, 1979.
- 10) Valeri, C. R. et al: Red cell 2.3DPG and creatine levels in patients with red cell mass deficits or with cardiopulmonary insufficiency. New. Engl. J. Med., 281, 1452-1455, 1969.
- 11) 横山 雄, 河内暁一, 心疾患と 2.3DPG, クリニカ, 6, 425-429, 1979.
- 12) Guest, G. M., and Rapoport, S.: Role of acid-soluble phosphorus compounds in red blood cells, Amer. J. Dis. Child. 58, 1072-1089, 1939.
- 13) 上田至宏：ヘモグロビンと 2.3DPG., クリニカ, 6, 404-409, 1979.