

# 岡山医学会雑誌

第86巻1. 2合併号 (第950. 951号)

昭和49年2月28日発行

## Rauscher ウイルス性白血病における血色素に関する研究

### 第 1 編

#### 正常マウスの血色素に関する研究

岡山大学医学部平木内科教室 (主任 平木 潔教授)

福 家 隆

【昭和49年1月9日受稿】

#### 目 次

I 緒 言	III 実験成績
II 実験材料及び実験方法	1 吸収曲線
1 実験材料	2 アルカリ変性試験
2 溶血液の作製	3 澱粉ゲル電気泳動法
3 吸収曲線	4 カラムクロマト法
4 アルカル変性試験	5 末梢血の Betke 染色
5 澱粉ゲル電気泳動法	IV 総 括
6 カラムクロマト法	V 考 按
7 末梢血の Betke 染色	VI 結 語

#### I 緒 言

最近生体の蛋白質の多元性 (multiplicity)あるいは不均質性 (heterogeneity)の問題が生物学上多大の関心をもってみられるようになった<sup>1)2)</sup>

このような領域で種々動物のヘモグロビンは好個の研究材料として従来最もよく用いられ、かつ最も

深く研究されてきたものの一つである<sup>3)4)</sup>

ところで、マウスは実験動物として最も繁用される動物でありながら、そのヘモグロビンについての検索は本邦においては殆んど行われていない。しかも、マウスヘモグロビンは蛋白合成の1つのモデル

として有用であり、その合成は遺伝的に規制されているので、<sup>9)</sup>著者は腫瘍とウイルスに関する研究の一環として Rauscher ウイルス性白血病における色素の性格を明らかにすることにより、本症の色素合成が異常な遺伝的支配下にあるかどうかを検索し、白血病ウイルスと宿主との関係を明らかにせんとした。<sup>10)</sup>以下の研究は正常マウスの色素につき、

Rauscher ウイルス性白血病マウスの色素の変化を観察するための control として検索した結果である。

## II 実験材料及び実験方法

### 1 実験材料

実験材料として cb 系の胎児、新生児、成熟マウス及び RF C<sub>57</sub>BL 成熟マウスを用いた。cb 系マウスは Houston の Baylor 大学より本学へ分譲されたもので milk agent を保有しない BALB/C 系マウスである。

### 2 溶血液の作製

新生児及び成熟マウスでは眼窩静脈叢を穿刺し採血した。胎児マウスよりの採血は、妊娠マウスの腹部を切開後羊膜を露出切開し、胎児を胎盤から分離してとり出し、生食水で洗った後頸部及び胸部を切開して採血した。採取した血液に直ちに二重蔞酸塩を加え、等張食塩水で反復洗滌し、脱イオン水で溶血後、0.5倍容のトルエンを加えて激しく振盪し遠沈濾過により澄明な O<sub>xg</sub>Hb 溶液を得た。<sup>11)</sup> COHb は O<sub>xg</sub>Hb 溶液に CO ガスを通して作製した。更に Cyanmet Hb は O<sub>xg</sub>Hb 溶液に 5% Potassium ferricyanide 及び 2% Sodium cyanide を加えて得た。<sup>12)</sup>

### 3 吸収曲線

日立 Spectrophotometer 124 により溶血液の吸収曲線を描いた。

### 4 アルカリ変性試験

Jonxis らの分光学的方法<sup>10)</sup>を用い、測定は 576 $\mu$ において行った。

### 5 澱粉ゲル電気泳動法

泳動は溶血液作製後 24 時間以内に行った。<sup>13)</sup>泳動条件は Smithies の水平法<sup>14)</sup>に準じ、緩衝液として Poulik の不連続系<sup>15)</sup>を用いた。ゲル作製用澱粉は Starch-Hydrolysed (Connaught Laboratories, Tronto, CANADA) 及び加水分解澱粉 Amylan (常光産業) を使用した。泳動は低温室内 (0~2℃) で白金線電極間 9 V/cm の電圧勾配下 4 時間行った。

泳動終了後アクリル樹脂製 guide strip と細鋼線によってゲル (5mm 厚) を厚さ 2mm と 3mm のものに薄切し、2mm のものは benzidine 試薬<sup>16)</sup> で染色した後、Glycerol に浸漬し<sup>17)</sup> 透明、弾力化して densitometry に供した。他の 1 枚は Amidoblac 10B 染色を行った。

### 6 カラム・クロマト法<sup>16)</sup>

1.5×30cm のガラス・カラムの 27cm の高さまであらかじめ 0.05 M Tris-HCl 緩衝液 (pH 8.6, 25℃) とよく平衡させておいた DEAE-Sephadex を充填した後、カラムを低温室 (0~2℃) に移し、同上緩衝液をさらに数日間流入液と流出液の pH が一致するにいたるまで流した。次いで O<sub>2</sub>-Hb 液 0.8cc をカラムに添加し、前記緩衝液により展開溶出した (流速 15 ml/hr.)。溶出液の採取は 3ml 毎、Toyo fraction collector type SF 200A によって行った。約 400ml の溶出液が流出し終わったところで、NaCl 添加により [Na<sup>+</sup>] を 0.3M とし pH 7.4 にしてカラムに吸着されている Hb を一挙に溶出させた。各溶出液は 280 $\mu$  及び 415 $\mu$  において吸光度を測定した。

### 7 末梢血の Betke 染色<sup>17), 18)</sup>

末梢血塗抹標本を 80% アルコールで 5 分間固定後蒸留水で洗い、直ちにまたは 1~2 時間氷室に入れた後、あらかじめ 37℃ に 15 分間保存した pH 3.4 の Citrate phosphate 緩衝液 (0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 26.6ml + 0.1M Citric acid 73.4ml) 中に 5 分間浸した後蒸留水で洗ったが、その間 1 分後及び 3 分後にスライドグラスを入れた容器を数回軽く振盪した。以上の操作の終わった塗抹標本に直ちに Ehrlich の acid hematoxylin 液を被せて 3 分間放置し、さらに Merk 社製の 0.1% Erythrosin で 3 分間重染色した。最後に水洗乾燥し鏡検した。なお acid hematoxylin 染色操作終了後軽く蒸留水で洗った方が染色された細胞と染色されない細胞とのコントラストが明確であった。塗抹固定後長時間経たした標本では鮮明なコントラストが得られないので採血塗抹後出来るだけ早く染色した。また acid hematoxylin 液は作製後 1 ヶ月以上経たのものを用いた。

## III 実験成績

### 1 吸収曲線

cb 系マウス末梢血のヘモグロビン溶液の吸収曲線は OxyHb 型を呈し、 $\alpha$  band (576 $\mu$ )、 $\beta$  band (541 $\mu$ ) 及び  $\gamma$  band (Soret band) (414 $\mu$ ) を示した (図 1)。

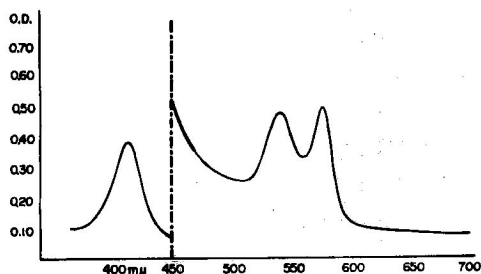


図1. cb系マウス溶血液の吸収曲線  
(450 $\mu$ 以下は試料を10倍稀釈して測定,  
pH6.5, 0.1M Phosphate Buffer 使用)

2 アルカリ変性試験

図2にcb系マウスのO<sub>2</sub>-Hbの20℃, 0.06N NaOH

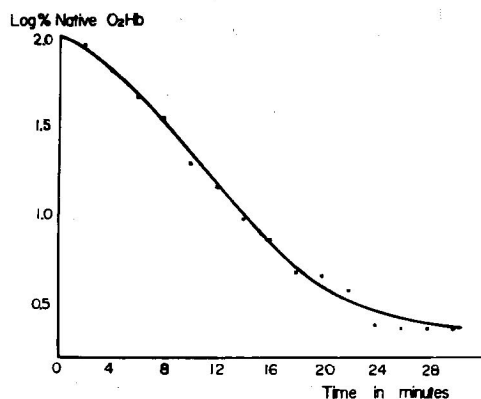


図2. cb系マウス溶血液のアルカリ変性曲線  
(20℃, 0.06N NaOH 使用)

中でのアルカリ変性曲線を示した。単一成分のみ存在し、かつ当該成分が1次反応の型式に従って変性するものとすれば濃度変化の対数を時間に対してプロットしたときの変性経過は直線となる筈であるから、ここに得られた曲線は明らかに2個あるいはそれ以上の成分が系内に存在していることを示唆した。

3 澱粉ゲル電気泳動法

成熟マウスでは主分画より速く移動する2分画及び主分画より遅く移動する1分画計4つのベンチデ

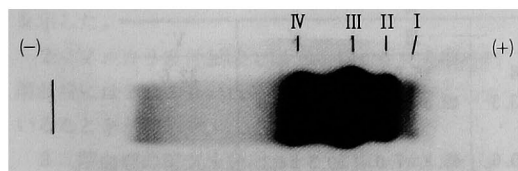


図3. cb系成熟マウスのシアンメトヘモグロビンの澱粉ゲル電気泳動  
(泳動時間4時間, Poulikの不連続緩衝系使用, ベンチジン染色施行)

ン陽性ゾーンを認め(図3)(陽極側よりI, II, III, IV分画と命名する),いわゆる diffuse pattern を示した。胎生早期マウスの溶血液では成熟マウスと同じ4つの分画の他に,成熟マウスで最も遅れて移動する分画よりも更に遅れて移動し,成熟マウスには存在しないし分画があり(V分画)計5つの分画を示した(図4最下段)。このV分画は胎生後期,

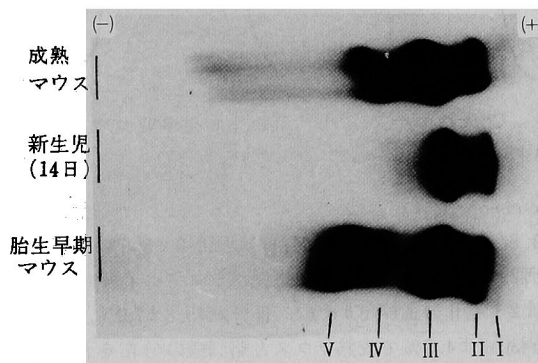


図4. cb系マウスのシアンメトヘモグロビンの澱粉ゲル電気泳動  
(泳動時間4時間, Poulikの不連続緩衝系使用, ベンチジン染色施行)

新生児では既に消失する。マウス及びヒトHbの主分画は全く同じ移動度を示したが,胎生早期のみ出

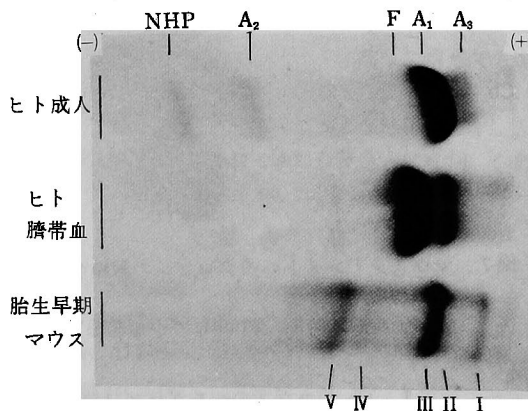


図5. ヒト及びCb系マウスのシアンメトヘモグロビンの澱粉ゲル電気泳動  
(泳動時間4時間, Poulikの不連続緩衝系使用, アミドブラック10B染色施行)

現するV分画はヒトHbFよりもかなり遅く移動した。(図5)。図6は成熟及び胎生早期マウスの Densitometryのパターンで陽極側よりI~IV分画を認め,胎生早期マウスではIV分画の陰極側に明瞭な1つの分画(V分画)が存在する。表1はこれらの泳動のSub-

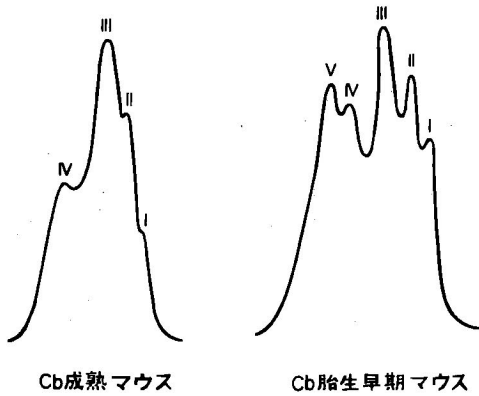


図6. 澱粉ゲル片のデンストメトリック・トレーシング

component の百分率で成熟マウスではI分画 $5.9 \pm 1.8\%$ , II分画 $14.4 \pm 2.5\%$ , III分画 $50.6 \pm 5.0\%$ , IV分画 $29.1 \pm 4.4\%$ であり, 新生児マウスではI分画 $6.1 \pm 2.1\%$ , II分画 $17.8 \pm 0.6\%$ , III分画 $45.8 \pm 7.0\%$ , IV分画 $30.3 \pm 4.3\%$ で成熟マウスと略同様の分布を示した. 胎生早期マウスではI分画 $10.7\%$ , II分画 $14.8\%$ , III分画 $25.5\%$ , IV分画 $16.4\%$  V分画 $32.6\%$ を認めた. 胎生後期マウスではI分画 $7.6 \pm 2.0\%$ , II分画

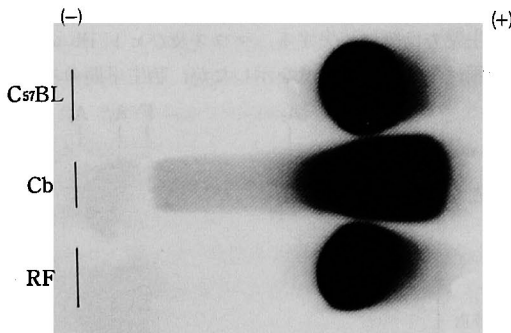


図7. マウスシアンメトヘモグロビンの澱粉ゲル電気泳動

(泳動時間4時間, Poulikの不連続系)  
(緩衝液使用, ベンチジン染色施行)

表1 Cb系マウスのヘモグロビン分画比

	%					
	I	II	III	IV	V	
胎児マウス	胎生早期*	10.7	14.8	25.5	16.4	32.6
	胎生後期 (2)	$7.6 \pm 2.0$	$22.5 \pm 3.3$	$42.8 \pm 0.8$	$27.2 \pm 6.0$	
新生児マウス (2)	$6.1 \pm 2.1$	$17.8 \pm 0.6$	$45.8 \pm 7.0$	$30.3 \pm 4.3$		
成熟マウス (25)	$5.9 \pm 1.8$	$14.4 \pm 2.5$	$50.6 \pm 5.0$	$29.1 \pm 4.4$		

\* シアンメトヘモグロビンにて泳動, その他はOxyHbにて泳動  
( ) 内はマウス数

$22.5 \pm 3.3\%$ , III分画 $42.8 \pm 0.8\%$ , IV分画 $27.2 \pm 6.0\%$ であった(表1). なおCb系以外のC<sub>57</sub>BL, RFマウス溶血液の電気泳動は図7のように, 1分画のみを示すsingle patternであったが, Cb系マウスの主分画と同じ移動度を示した.

#### 4 カラム・クロマト法

図8. に示したのは陽イオン交換剤 DEAE-Sep-

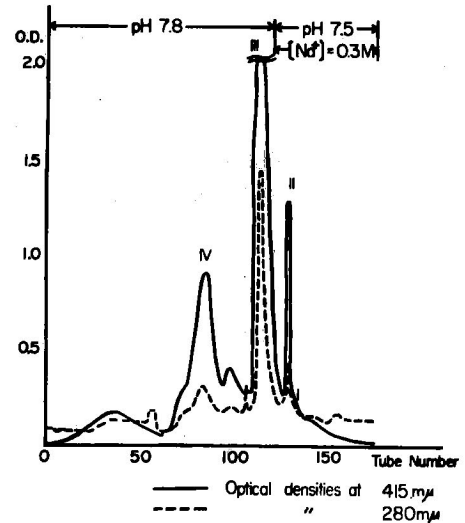


図8. Cb系成熟マウスのオキシヘモグロビンのカラムクロマトグラム

(陽イオン交換剤 DEAE-Sephadex 使用)

hadex を用いて得た結果で, 4 個のピークがかなり明瞭に分離している. 澱粉ゲル電気泳動におけるIV分画に相当する分画が最初に分離し, 以下III, II及びI分画が分離した. 紫外部(280mμ)での吸収によって得た結果と Soret 帯(414 mμ)での吸収によって得た結果を比較するとクロマトグラム全域にわたって Soret 帯吸収が紫外部吸収を上まわっている.

#### 5 末梢血のBetke 染色

Betke 陽性赤血球は成熟赤血球1000に対し胎生後期では400, 新生児(3日)では392, 以後急速に減少

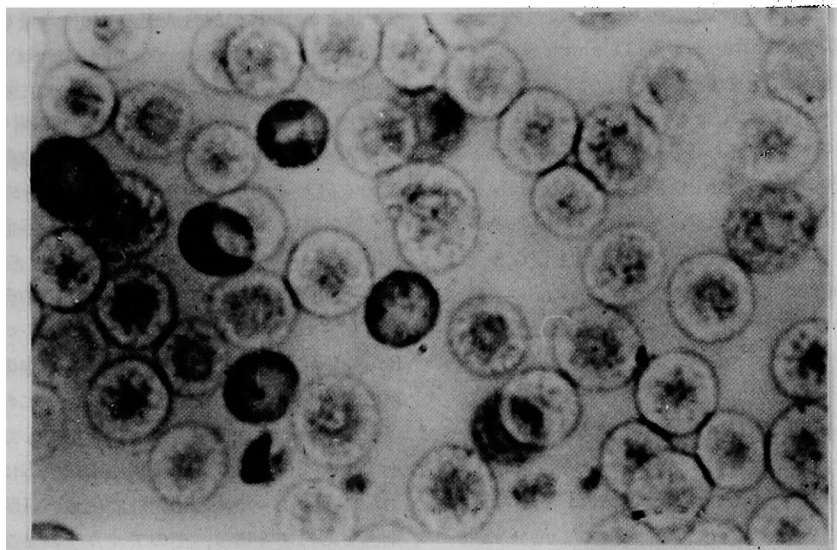


図9. Cb系マウスの Betke染色×1,000.

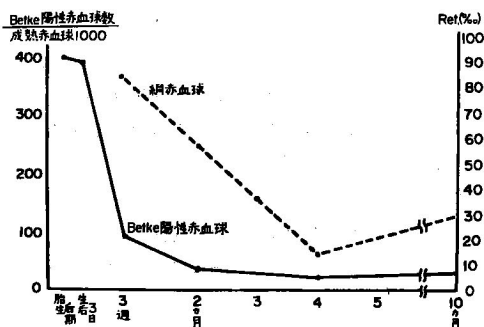


図10. Cb系マウスの Betke 陽性赤血球の経時的变化し、生後3週で96、2ヶ月で40、成熟マウスでは18~27を示した(図9, 10)

総括

1 cb系マウス末梢血のモグロビン溶液の吸収曲線は OxyHb 型を呈し  $\alpha$  band (576m $\mu$ ),  $\beta$  band (541m $\mu$ ) 及び  $\gamma$  band (Soret band) (414m $\mu$ ) を示した。

2 アルカリ変性試験では cb系マウス末梢血の溶血液には2個あるいはそれ以上の成分が存在していることを示唆した。

3 溶血液の電気泳動において成熟マウスでは4分画、胎生早期マウスでは5分画、胎生後期マウスでは成熟マウスと同様4分画を示した。分画比は成熟マウスではI分画5.9±1.8%, II分画14.4±2.5%, III分画50.6±5.0%, IV分画29.1±4.4%, 新生児マ

ウスではI分画6.1±2.1%, II分画17.8±0.6%, III分画45.8±7.0%, IV分画30.3±4.3% 胎生後期マウスではI分画7.6±2.0%, II分画22.5±3.3%, III分画42.8±0.8%, IV分画27.2±6.0% 胎生早期マウスではI分画10.7%, II分画14.8%, III分画25.5%, IV分画16.4%, V分画32.6%であった。

4 陽イオン交換剤 DEAE-Sephadex を用いて溶血液中のヘモグロビン分子を分離した結果でも4個のピークがかなり明瞭に分離した。

5 Betke 陽性赤血球は成熟赤血球1000に対し胎生後期に400、生後3日で392、以後急速に減少して成熟マウスでは18~27を示した。

IV 考 按

[I] 実験方法

1 実験材料について

マウスヘモグロビンは遺伝的統御をうける蛋白合成の好個の材料として注目され、主として電気泳動法によって二大別され、<sup>19)</sup> single type と diffuse type に分けられるが、single type とは電気泳動上 'discrete single band' を示すものであり、diffuse type とは 'two or more components' を示すものである。<sup>20)</sup> single type としては C<sub>57</sub> BL/6, C<sub>57</sub> BR/cd, C<sub>57</sub> L/He, C<sub>58</sub>, SEL/RE, SWR 及び WK マウスが含まれ、diffuse type には、A/He, A/Jax, AKR, BALB/C, C 3 H/Jax, C 3 HeB, DBA/1, DBA/2, MA/MY, REM, 129, WB, WC, WH 及び CBA マウスが含まれる。<sup>19)</sup> しかも di-

ffuse type の内でも系統間にかなり異ったパターンを示している。<sup>11,21</sup> diffuse type は single type に比べ疾患による変化を検索する場合、その変化が複雑になる可能性があるが、一方その変化を敏感に反映する場合も考えられる。著者は Rauscher ウイルスに最も感受性のある BALB/C 系マウス (cb 系マウス) を使用したが、この系統のマウスの色素は前述のように泳動上 diffuse type に属すること以外にその Heterogeneity に関する詳細な報告は未だ認められない。

## 2 溶血液の作製について

一般にヒトヘモグロビンの場合 OxyHb より COHb 及び Cyanmet Hb ははるかに安定であるとされているが<sup>22</sup>、マウスヘモグロビンはヒトヘモグロビンよりはるかに不安定であり、変性しやすく<sup>11</sup>、著者は最初 Cyanmet Hb に変換して泳動を行ったが、Cyanmet Hb でも割合早く変性しやすく、泳動してみると application の陽極側に変性したヘモグロビンが沈着し、あたかも異常分画の出現したかのようなパターンを示し、その後の Densitometry を不正確にする恐れがあったので OxyHb のまま溶血液作製後 24 時間以内に泳動を行った。この変性しやすいことがマウスヘモグロビンの分析を困難にし、ヒトヘモグロビン程深く研究されていない一因と思われる。

## 3 溶血液の電気泳動法について

電気泳動には澱粉ゲル電気泳動法を用いたが、1955 年 Smithies<sup>12)</sup> は澱粉ゲルを電気泳動の支持体として使用して驚くほど見事な成績を報告した。その長所としては蛋白分子の大きさや形状の相異による分子フルイ効果により易動度に影響を与え、この分子フルイ効果と荷電による分離が複合されて最も優れた分離能を有する。一方短所としてはゲルを作る際の加熱方法がむづかしいこと、各分画の抽出が完全にできない上、定量的な扱いをするのに困難があること、分離はよいが分離した成分の同定には一層困難な問題が残っていること等である。しかし著者は澱粉ゲル、セルロースアテレート膜、寒天ゲル、シアノガム等の支持体を用いたがマウスヘモグロビンの場合、澱粉ゲルに比べて他の方法では分離能が低く、定量的取扱いにたえられなかった。

## 4 末梢血の Betke 染色について

元来 Betke 染色はヒト HbA 含有赤血球とヒト HbF 含有赤血球を識別するために考案された方法である。即ち、HbF はアルカリに対して HbA よりも強い抵抗性を持って容易に変性しない<sup>23)</sup> この性質を利用し

て HbA と HbF の混合液内の HbF 含量を測定できるが (Singer<sup>23)</sup>, Brinkmann-Jorxis<sup>24)</sup> 或いは Betke 法<sup>25)</sup>) HbF は酸に対してもまた強い抵抗性を有している。Betke はこの性質を利用して血液塗抹標本を鏡検して HbF を含有する赤血球を HbA 含有のものとして識別する方法を考案した。その結果 HbF 含有赤血球は赤く染色され、HbA 含有赤血球は殆んど染色されずあたかも ghost cell のように見える。さて近年腫瘍細胞における胎児性蛋白の合成の問題が注目されているが著者は第 2 編にのべるように Rauscher 白血病における赤血球系細胞の増殖の腫瘍性を研究する一方法として本白血病における赤血球系細胞の胎児性色素について検討したが、第 1 編ではまず正常マウスの末梢血塗抹標本にこれを応用した。しかしマウスの胎児性色素の証明に Betke 染色を応用するには、そのアルカリおよび酸抵抗性の性格を明らかにする必要があるがともかくマウスにおいても Betke 染色では陽性と陰性の対照は明瞭であり胎児期には陽性率が高く生後急激に減少した点より陽性赤血球はヒトの場合と同じく胎児性の性格を有する色素を含有することが推定される。しかし上記の問題点については今後の検討が必要であろう。

## (II) 実験成績

### 1 吸収曲線、アルカリ変性試験

cb 系マウス末梢血の溶血液の吸収曲線は OxyHb に特有の吸収曲線を示した。

アルカリ変性試験では成熟マウスヘモグロビンは図 2 のように曲線となり数ケの不均質成分の存在を示唆した。しかし胎生後期マウスヘモグロビンのアルカリ変性試験はその血液を多量採取することが出来なかつたので実施し得なかつた。従って胎児、新生児、成熟マウスでアルカリ変性試験に差異があるかどうか不明であるが、CBA マウスでは、Barrowman は新生児、胎児では、成熟マウスと全く差異はなかつたと述べている。<sup>26)</sup>

### 2 澱粉ゲル電気泳動法、Betke 染色

cb 系マウスヘモグロビンは澱粉ゲル電気泳動上いわゆる diffuse type を示し、4 分画を示した。しかし diffuse type の間にも系統間で変化があり AKR, C3H は 2 major bands と 1 minor slowly moving band, Swiss, DBA 2 は 3 major bands と 2 minor bands を示し<sup>11)</sup>、CBA では少くとも 3 分画を有することが報告されている。<sup>20)</sup> 又 cb 系の胎生早期マウスでは成熟マウスには存在しない最も遅く移

動する分画 (V分画) があるが、この分画は胎生後期に既に消失する。マウスの胎児性ヘモグロビンについては C<sub>57</sub>BL/6J、AKR及びCBAについて報告がある。C<sub>57</sub>BL/6J では妊娠12日には3分画であるが13日には主分画が出現し、出生時には主分画のみとなり<sup>20)</sup> AKRでは妊娠14日には4分画が存在し、成熟マウスでは2分画となり<sup>20)</sup> CBAでは胎生早期には4分画であるが次第に slowest moving band は不規則となり16日には adult pattern になる<sup>20)</sup>

以上の如くマウスの胎児ヘモグロビンについても各系統によってかなりパターンは異っているけれども、single type でも diffuse type でも胎生早期に出現する小分画は次第に消失したり、相対的濃度の変化をきたし、胎生後期には adult pattern になり、成熟マウスになると主分画が最も増量するようである。

さらに cb 系マウスのヘモグロビンとヒトヘモグロビンを比較すると類似点としては cb 系マウスの主分画はヒト Hb A<sub>1</sub> と全く同じ移動度を有する。佐藤<sup>4)</sup>によれば主分画を構成するポリペプチッドのアミノ酸組成がマウスとヒトでは殆んど同じであり、泳動における正味の荷電以外に分子の大きさ、形も殆んど同じためであろうと推定している。相違点としては i) cb 系マウスでは胎生早期に出現した分画は HbF よりかなり遅く移動し、胎生後期に既に消失し成熟マウスのパターンとなる。ii) ヒトヘモグロビンの場合 fast moving component は主分画であるが、cb 系マウスでは CBA マウスと同じように<sup>20)</sup>主分画より速く移動する2つの小分画がありヒトヘモグロビンとは全く異っている。iii) ヒトヘモグロビンの小分画は A<sub>2</sub>及び A<sub>3</sub> でありいずれも 2% 以下の微量であるが cb 系マウスでは表 1 のようにかなりの量比で小分画が存在する。

以上の如く澱粉ゲル電気泳動法では4個の分画が認められるが Hb (Fe<sup>++</sup>) の MetHb (Fe<sup>+++</sup>) 化によって見かけ上の不均質成分が出現している可能性がある<sup>4)</sup>。しかし溶血液作製後24時間以内に OxyHb のまま、或いは Cyanmet Hb に変換し両者間に泳動上全く差異のないことを確認しているのでこのような懸念は全くないといえる。又ヘモグロビン分子の会合や脱会合により泳動上、一見不均質成分の存在を疑わしめる像を呈する可能性があり、事実 Riggs<sup>20)</sup>は BALB/CJ マウスヘモグロビンの中には4量体分子中のβ鎖の13番目の Cystein の S-S 結合

による8量体分子も含まれていると指摘している。しかし著者の BALB/C 系マウスの主分画を形成するα鎖には Cystein がN末端より104番目に位置しているが<sup>21)</sup>β鎖のアミノ酸配列については未だ報告がなく Cystein によるヘモグロビン分子の会合が存在するか否か不明である。更に小分画間の会合や脱会合については更に全く不明である。

以上述べてきたところから cb 系マウスのヘモグロビンには、それぞれ物理化学的性状を異にする4種の不均質成分が互いにかかなりの量比で存在していることが明らかになった。そこで次にイオン交換カラムクロマト法を用いてこれらの成分の分離を企図し、4個のピークがかなり明瞭に分離し、澱粉ゲル電気泳動像と一致した。

従って正常マウス血色素のアルカリ変性試験、澱粉ゲル電気泳動及びカラムクロマト法等の定性的ならびに定量的検索の結果からも、最終的結論は各成分を単離純化し、その一次構造を決定するまで待たねばならぬことはいうまでもないが、cb 系マウスヘモグロビンにみられた4個の分画は2次的なものでなく、それぞれ別個の遺伝子の支配下に形成される別個の分子種であると推定される<sup>21)</sup> <sup>22)</sup>

最後に著者は cb 系マウスの末梢血の塗抹標本に Betke 染色を実施したが、Meier<sup>23)</sup>は母を酸溶出性ヘモグロビンを有する C<sub>57</sub>BL/6 及び BALB/C とし、父を酸抵抗性ヘモグロビンを有する A/J 及び DBA/2 とする hybrid は2つのタイプの赤血球をもつことを明らかにした。すなわち胎生15日の胎児 (C<sub>57</sub>BL/6 ♀ × DBA/2 ♂) の塗抹標本を 37℃、15分間、pH 3.5 の acid phosphate buffer で処理後、ferric ferriocyanide reduction にて染色したとき陰性 (溶出性) の赤血球は母 (C<sub>57</sub>BL/6) 由来であり、非溶出性の赤血球は DBA/2 由来の胎児赤血球としている。

著者は酸溶出性ヘモグロビンを有する BALB/C 系の cb 系マウスの Betke 染色において、溶出性及び非溶出性の2種の赤血球の存在を認めたが、著者が用いた Betke 染色も Meier の実験と同じ phosphate buffer を用いており、ただその後の染色方法が異なるだけであり本質的差異はない。従ってこの2種類の赤血球の存在は遺伝的に統禦されており、非溶出性の Betke 陽性赤血球は胎生後期に多く、生後急速に減少しヒト HbF を構成するγ鎖と同じ傾向を有するので胎児赤血球と考えている。

## 結 語

Rauscher ウイルス性白血病の血色素の変化を観察するための control として、正常マウスの血色素を検索し、溶血液の吸収曲線を描き、OxyHb 型の吸収曲線を認め、アルカリ変性試験では2つ又はそれ以上の成分の存在を示唆し、溶血液の濃粉ゲル電気泳動では胎生前期には5分画、胎生後期、新生児、成熟マウスでは4分画を示し、その分画比を計算した結果Ⅱ分画は胎生後期に比較し成熟マウスで減少したがⅢ分画は増加が認められた。ヒト血色素との比較では電気泳動上マウスの血色素の主分画はヒト Hb A<sub>1</sub> と同じ移動度を有するが、胎生早期に出現す

る分画は HbF より遅く移動した。又溶血液のカラムクロマト法では4分画の存在を確認し、Betke 染色では Betke 陽性赤血球は胎生後期、新生児に多く、以後急速に減少した。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師平木潔教授に深甚の謝意を表します。又終始多大の御援助と御指導をいただいた平木内科入野昭三講師、瀬崎達雄講師及び川崎大学紫田進教授、山口大学宮地隆興教授に深謝いたします。

(本論文の要旨は昭和44年第31回日本血液学会総会及び昭和44年第20回電気泳動学会総会において発表した。)

## 文 献

- 1) Jayle, M. F. & Moretti, J. : Hepatoglobulin : Biochemical genetic and physiopathologic aspects . Trocants, L. M. : Progress in Hematology Vol . 3, PP342~359, Grune & Stratton (New York, London) , 1962.
- 2) Smithies, O. & Connell, G. E. : Biochemical aspects of the inherited variations in human serum haptoglobins and transferrins . Wolstenholme, G. E. W. and O' Connor, C. M. : Biochemistry of Human Genetics . PP178~193, Churchill (London) 1959.
- 3) Gratzler, W. B. & Allison, A. C. : Multiple Haemoglobins . Biol . Rev . , 35 : 459~506, 1966.
- 4) 佐藤一之 : シロネズミのヘモグロビンの不均質性. 奈良医学雑誌, 17 : 300~310, 1966.
- 5) Hutton, J. J., Schweet, J. B. R. & Russell, E. S. : Hemoglobin Inheritance in Inbred Mouse Strains, I. Structural Differences . Proc . N. A. S. , 48 : 1505~1513, 1962.
- 6) Hutton, J. J. , Schweet, J. B. R. & Russell, E. S. : Hemoglobin Inheritance in Inbred Mouse Strains, II. Genetic Studies . Proc . N. A. S. , 48 : 1718~1724, 1962.
- 7) Ambs, E. & Thorell, B. : On the Type of Hemoglobin in the Neoplastic Cell of Virus-Induced Fowl Erythroleukemia . J. Nat. Cancer Inst . , 25 : 685~695, 1960.
- 8) 柴田進, 井内岩夫 : 異常血色素. 最新医学, 15 : 2567~2581, 1960.
- 9) Rozman, R. S. , Satks, R. P. & Kates, R. : Rapid measurement of hemoglobin A<sub>1</sub> by means of cellulose acetate membrane electrophoresis . J. Lab. & Clin. Med. , 62 : 692~698, 1963.
- 10) Jonxis, J. H. P. & Visser, H. K. A. : Determination of Low Percentase of Fetal Hemoglobin in Blood of Normal Children . Amer. J. Dis. Child. , 92 : 588~591, 1965.
- 11) Rosa, J. , Schapira, G. , Dreybus, J. C. , Grouchy, J. , Mathe, G. & Bernard, J. : Different Heterogeneities of Mouse Haemoglobin according to Strains . Nature , 182 : 947~948, 1958.
- 12) Smithies, O. : Zone Electrophoresis in Starch Gels : Group Variations in the Serum Proteins of Normal Human Adults . Biochem. J. , 61 : 629~641, 1955.
- 13) Poulik, M. D. : Starch Gel Electrophoresis in a Discontinuous System of Buffers . Nature , 180 : 1477~1479, 1957.



- 14) 榎泰義, 富田晋, 森川三郎: ダイコクネズミのヘモグロビンの不均質性. 科学, **33**: 316, 昭38.
- 15) Gratzner, W. B. & Beaven, G. H. : Transparent Starch Gels : Preparation, Optical Properties and Application to Haemoglobin Characterisation. Clin. Chim. Acta, **5**: 577-582, 1960.
- 16) Huisman, T. H. J. & Dozy, A. M. : Studies on the Heterogeneity of Hemoglobin IX. The Use of Tris (Hydroxymethyl) Aminomethane-HCl Buffers in the Anion-Exchange Chromatography of Hemoglobins. J. Chromatog., **19**: 160-169, 1965.
- 17) Kleihauer, E. & Betke, K. : Praktische Anwendung des Nachweises von HbF-haltigen Zellen in fixierten Blutaussstrichen. Der Internist, **1**: 292-295, 1960.
- 18) Kleihauer, E., Braun, H. & Betke, K. : Demonstration von Fetalem Hämoglobin in den Erythrozyten. Klin. Wschr., **35**: 637-638, 1957.
- 19) Russell, E. S. & Gerald, P. S. : Inherited Electrophoretic Hemoglobin Patterns among 20 Inbred Strains of mice. Science, **128**: 1569-1570, 1958.
- 20) Barrowman, J. & Craig, M. : Hemoglobins of Foetal C<sub>57</sub>BL/6 Mice. Nature, **190**: 818-819, 1961.
- 21) Welling, W. & Bekkum, D. W. : Different Types of Hemoglobin in Two Strains of Mice. Nature, **182**: 946-947, 1958.
- 22) Hutchison, H. E. : An Introduction to the Haemoglobinopathies and the Methods used for their Recognition. PP. 65-66, Edward Arnold (Publishers) Ltd, London, 1967.
- 23) Singer, K., Chernoff, A. I. & Singer, L. : Studies on abnormal hemoglobins I. Their Demonstration in Sickle Cell Anemia and other Hematologic Disorders by means of Alkali Denaturation. Blood, **6**: 413-428, 1951.
- 24) Brinkman, R. & Jonxis, J. H. P. : The occurrence of several kinds of hemoglobin in human blood. J. Physiol., **85**: 117-127, 1935.
- 25) Betke, K. & Kleihauer, E. : Die Fällungsmethode : Fetales Haemoglobin und fetale Erythrozyten. Seiten 10-12, Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart, 1966.
- 26) Barrowman, J. & Roberts, K. B. : Haemoglobins of Foetal CBA Mice. Nature, **169**: 409-410, 1961.
- 27) Craig, M. L. & Russell, E. S. : A Developmental Change in Hemoglobins Correlated with an Embryonic Red Cell Population in the Mouse. Developmental Biology, **10**: 191-201, 1964.
- 28) Craig, M. L. & Russell, E. S. : Electrophoretic Patterns of Hemoglobin from Fetal Mice of Different Inbred Strains. Science, **142**: 398-399, 1963.
- 29) Riggs, A. : Hemoglobin Polymerization in Mice. Science, **147**: 621-623, 1965.
- 30) Riggs, A. : Polymerization of Hemoglobins of Mouse and Man : Structural Basis. Science, **158**: 800-802, 1967.
- 31) Popp, R. A. : Hemoglobin variants in mice. Federation Proceedings, **24**: 1252-1257, 1965.
- 32) Popp, R. A. : Hemoglobin Loci : Mice Classified for Their Hb and Sol Alleles. Science, **140**: 893-894, 1963.
- 33) Meier, H. & Roscoe, B. : Some Physico-Chemical Properties of Mouse Red Cell and Hemoglobin. Experientia, **15**: 215-216, 1961.

福 家 隆

## Studies on Hemoglobin in Rauscher Leukemia

### I. Studies on Hemoglobin in the Normal Mouse

by

**Takashi Fuke**

Department of Internal Medicine,  
Okayama University Medical School.  
(Director : Prof . K. Hiraki )

When hemoglobin of the normal mouse was studied as a control to observe the changes in hemoglobin of Rauscher Leukemia , the absorption curve of hemolysate was drawn and an OxyHb type of absorption curve was observed .

In alkali denaturation test the existence of two or more components was suggested . By means of starch-gel electrophoresis of hemolysate five components were observed in early fetus and four components in late fetus, newborn and adult mice and then their component ratios were calculated .

By column chromatography of hemolysate the existence of four components was certified and by Betke's staining Betke positive erythrocytes were found numerous in late fetus and newborn mice and they decreased rapidly in number afterwards .