612.111.1 : 539.155.2.06 : 546.72

放射性鉄による易分離鉄の研究

第 3 編

Starch Block Electrophoresis による血色素易分離鉄の検討

岡山大学医学部第一内科教室（主任：小坂淳夫教授）

田　渕　博　司

〔昭和38年9月28日受稿〕

I. 緒　言

幼若赤血球内で生成された heme が成熟赤血球をまたず容易に分解される事実については前編で述べたが，胆汁色素に分解されるとすれば，heme には担体の結合が必要であり[1]，その分解が赤血球内で行なわれるのであるから globin の結合，即ち血色素の型として生成され，さらに分解されるものと考えざるをえない．そうすると担体 globin の性状に疑問がある．即ち血色素の分解には担体 globin に可逆的乃至非可逆的な僅かな変性を伴なうことが第一条件と考えられるから，ここに生成された血色素の性状は糾明されなければならない．

そこで著者は最近異常血色素の研究にともない著しい進歩をとげた血色素泳動法の中から Kunkel の原法[2]にもとづく澱粉を支持体とする zone electrophoresis を選び放射性鉄標識血色素の泳動を行なつて血色素を分離し，その各分画について易分離鉄（以下 E S Fe と略す）を中心に検討を行なつた．

II. 実 験 方 法

1. 実験材料

1.1. 放射性鉄

前編と同じく $Fe^{59}Cl_3$ を使用した．

1.2. 実験動物

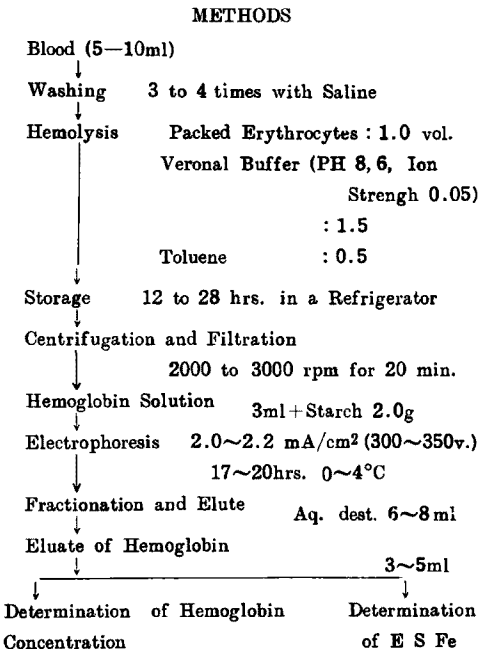
健康家兎並びに瀉血貧血家兎を用いた．

2. 実施方法

2.1. 試料調製法

Fig. 1. のごとく Singer[3] 並びに福武[4]，鈴木[5]の法にならい，まず二重蓚酸塩で凝固を阻止した家兎血液 3ml をとり遠心して血漿層を吸引除去し，残りの血球層を生理的食塩水で数回遠沈洗滌し上澄を除き赤血球を完全に洗う．この赤血球1容に対して1.5容のベロナール塩緩衝液（PH 8.6，イオン強度0.05）および0.5容の toluene を加え激しく2～3分間振盪後，冷蔵庫中に12乃至24時間放置し完全に溶血させる．次に3000回20分間遠沈し，toluene 層，赤血球ストローマ層を毛細管ピペットで吸引除去し，残つた溶血液を東洋濾紙 No. 6 で濾過して透明な溶血液を得る．この時の血色素濃度は約10g/dl であつた．

Fig. 1. Methods of starch block electrophoresis of hemoglobin.



2.2. Starch block electrophoresis[2)5)6)7)]

泳動装置は中村[8]が Kunkel の原法[2]にもとづいて作製した共和応用物理研究所製の zone 電気泳動

装置を用いた．泳動槽の大きさは40.0×3.0×1.5cm，緩衝液は試料調整の場合と同様 pH 8.6，イオン強度0.05のベロナール塩緩衝液を用いた．次に支持体は局方馬鈴薯澱粉（藤沢製）を用いた．澱粉は再蒸溜水で3回洗浄後乾燥させ，使用時に緩衝液で更に3回洗い澱粉中の緩衝液濃度を電極及び緩衝液槽のものと等しくした後，泳動槽に流しこみ，濾紙をおしあてて過剰の緩衝液を除き，澱粉面を正しく平面にする．装置全体を氷室内に入れ，同条件のベロナール塩緩衝液を入れて用意しておいた泳動装置の電極槽にとりつけ1時間空通電した後，泳動槽をとり出し陰極端より 15cm の部分を原点として澱粉を 1cm 巾に完全に取り除き，前もつて調製した試料 3ml 含むペースト状澱粉を充塡して泳動槽の蓋を密閉し，両端を厚目の濾紙で押さえ，ガーゼを当てて緩衝液槽中に浸する．

その後澱粉柱の断面積あたり 2～2.2mA（総電圧 300～350 V）の電流で 17～20時間通電泳動した．通電は温度上昇を防ぐ為 0～4°C の氷室内で行なつた．

泳動後血色素の着色状態を詳細に観察したのち，各分画の血色素着色澱粉を遠沈管に分けて取り出し，再蒸溜水を加え攪拌し遠心沈澱して上清の血色素溶液を抽出した．この操作を完全に澱粉から血色素が抽出されるまでくりかえし行なつた後，各々の抽出血色素溶液について諸種検討した．

2.3. Fe^{59} 標識血色素の作製

第1編で述べたと同様の方法で Fe^{59} 標識赤血球を得，これを前述の試料調製法に従つて溶血して作製した．

2.4. 非放射性鉄剤の投与

家兎生体内で Fe^{59} 標識赤血球を得る場合は第1編と同様，非放射性鉄の大量投与を行なつた．

3. 測定方法

3.1. 血色素溶液吸光度曲線描写法

Beckman の Recording Spectrophotometer Model D.K. によつた．

3.2. 血色素濃度の測定

シアンメトヘモグロビン法によつた．

3.3. 放射能測定

前編と同じく神戸工業製 Well 型 scintillation counter PS-IB 型を用いて計測した．

3.4. 易分離鉄測定法

比色定量の場合は抽出した血色素液 5ml について Barkan, G. の o-phenanthrolin 法[9] に準じた教室木戸の方法[10] によつて測定し，求めた鉄量は全てその際の血色素濃度に対する比率，即ち，

$$\text{ratio}\ (100\gamma/\text{mg}) = \frac{\text{E S Fe}(\gamma/\text{dl})}{\text{Hb}\ (\text{mg/ml})}$$

で表わした．

放射性 E S Fe の測定法は試料が血色素溶液である以外は第1編と同じで，血色素鉄に対する割合，即ち

$$\text{ratio}(\%) = \frac{\text{E S Fe}^{59}}{\text{H b Fe}^{59}}$$

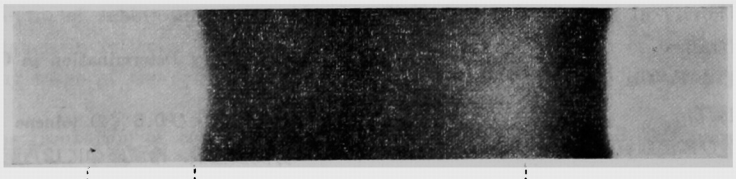
で表わした．

IV. 実験成績

1. 電気泳動像

健康家兎血色素の starch block electrophoresis を行なつてみるとFig. 2のごとく3分画に分離される．

Fig. 2. Starch block electrophoresis of normal rabbit hemoglobin.



Cathode　　Anode

II Fraction　I Fraction　III Fraction

即ちII分画はI分画より泳動速度が遅く陰極側に明確な帯状として分離して認められ，III分画は泳動速度が速くI分画に先行して陽極側に分離されるがI分画と接して境界はやや不明確である．なおIII分割は試料の充塡法（前述）の相違の為，Kunkel[6] 並びに Singer ら[11]による泳動像のごとく鋭い突起は作らず先端は澱粉柱長軸と直角をなした巾 1cm 前後の帯として認めた．

2. 吸光度曲線

各分割につき血色素溶液を抽出してその吸光度曲線を描くと Fig. 3 のごとく各分割ともに同一で全て 578, 542, 414 mμ に極大をもつ血色素であり，その誘導体乃至分解物の混入はないものと判定された．

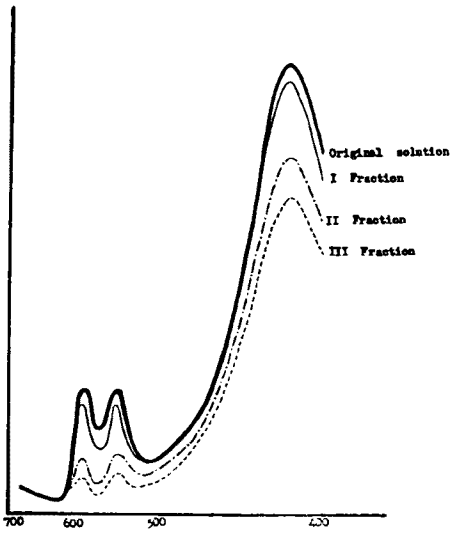
3. 各分割血色素量並びに易分離鉄量

健康家兎の血色素各分割につき，その血色素量及び血色素 1mg に対する E S Fe の量を測定すると Table. 1，Fig. 4 のごとく血色素量はI分割が最も多く平均77.6%を占めII分割は19.3%でIII分割は1.9%に過ぎなかつたが，血色素量に対する E S Fe 量比は泳動前の試料である血色素原液，I分割，II分割ともほぼ近似の値であるのに対してIII分割には著しく多く含まれていることがわかる．

4. 遊離鉄の検討

血色素原液及び各分割の血色素中の遊離鉄を湯浅の方法[12]により，1.2%塩酸の代りに蒸溜水を加えた場合及び0.4%の割に塩酸を加え16時間38°C 恒温槽に放置することなく直ちに測定した場合について検討すると，比色定量法並びに Fe^{59} 標識法による遊離鉄ともに，E S Fe の中に占める割合は，Table. 2，Fig. 5 のごとく主としてI，II分割に多く，III分割にはほとんど遊離鉄の存在を認めなかつた．

Fig. 3. Absorption spectra of hemoglobin original solution and each fraction eluates.



5. 各分割比放射能の態度

各分割の特異性をみる為に瀉血貧血家兎の耳静脈にあらかじめ調整した Fe^{59}-globulin 液を注入し型のごとく経時的に採血後試料を調整して Fe^{59} 標識血色素液の電気泳動を行ない，原液，I，II，III分

Table 1. Hemoglobin concentration and E S Fe in original solution and each fraction eluates.

Hb. / Fr. / Subj.	E S Fe/Hb. (100γ/mg)				% of Hb.		
	Orig.	I	II	III	I	II	III
1	4.19	3.75	4.35	11.80	90.1	8.5	1.4
2	4.41	3.66	4.88	5.00	84.8	13.9	1.3
3	6.23	6.62	13.84	18.80	91.9	4.8	3.3
4	6.18	6.75	9.85	23.80	92.0	4.9	3.1
5	6.67	6.29	5.94	15.10	66.8	31.3	2.0
6	6.59	7.22	6.47	24.10	63.6	35.4	1.2
7	8.38	7.33	5.68	20.00	70.1	27.9	1.9
8	5.94	6.46	6.48	26.18	71.6	27.3	1.2
mean	6.07	6.01	6.69	18.10	77.6	19.3	1.9
s.e.	± 0.43	± 0.48	± 1.05	± 2.38	± 3.9	± 4.5	± 0.03

Orig. : Original Hb Solution

Fig. 4. F S Fe/hemoglobin ratio and distribution of hemoglobin of normal rabbit.

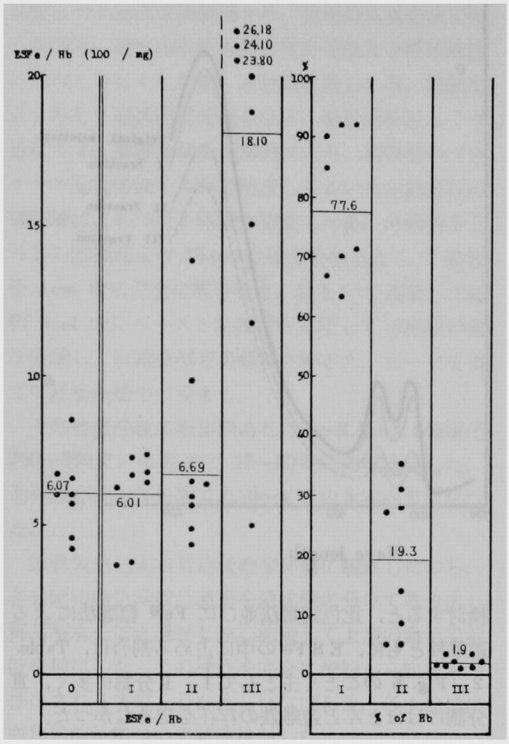
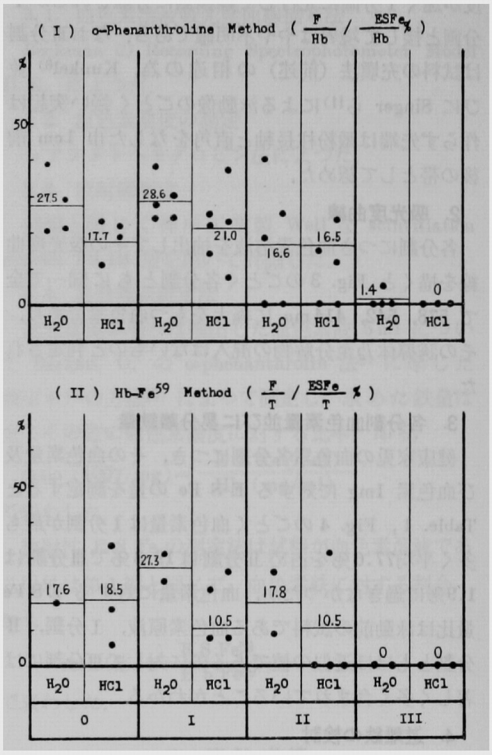


Fig. 5. Free iron/E S Fe ratio in hemoglobin original solution and each fraction eluates.



Tables 2. Free iron in hemoglobin original solution and each fraction eluates.

		Free iron by o-phenanth. method $\left(\frac{F}{Hb}/\frac{ESFe}{Hb}\%\right)$	No. of experiments averaged	Free iron by Hb-Fe^{59} method $\left(\frac{F}{T}/\frac{ESFe}{T}\%\right)$	No of experiments averaged
Orig	H_2O	27.5	4	17.6	1
	HCl	17.5	4	18.5	3
I	H_2O	28.6	5	27.3	2
	HCl	21.0	6	10.5	4
II	H_2O	16.6	5	17.8	2
	HCl	16.5	5	10.5	4
III	H_2O	1.4	4	0	2
	HCl	0	3	0	3

劃中の血色素（mg）に対する血色素全鉄（Hb Fe^{59}）の比放射能を求めてみると，Fig. 6のごとく，それぞれ異る値を得た．しかも興味あることは初期より第3週まではⅢ分劃の比放射能はⅠ分劃のそれより低値であるが第4週以後では却つて高い値を示した．

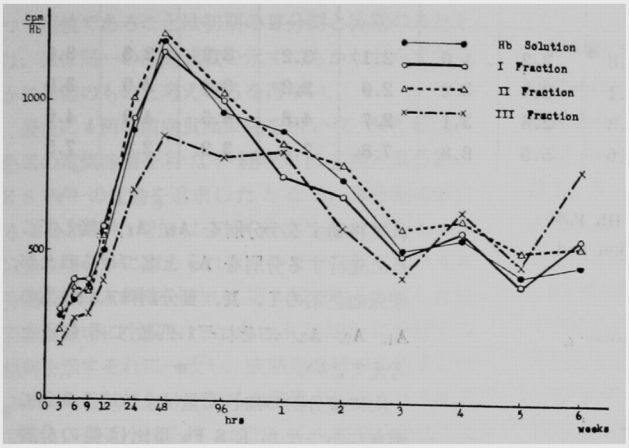
6. 各分劃 E S Fe^{59} の赤血球年令に伴う変動

前項の実験と同様瀉血貧血家兎に Fe^{59} 液を注射し，経時的にその血色素の電気泳動を行ない，各分劃の $HbFe^{59}$ 中に占める E S Fe^{59} の割合で求めると Table. 3，Fig. 7のごとく4例ともⅢ分劃の E S Fe^{59} のみが Fe^{59} 液投与後の初期3～12時間に著しく増加し，以後緩慢に減少し第4週以後再び増加の傾向を示した．即ち観察期間が最長6週間までの為，その後の傾向は追及しえないがⅢ分劃における E S Fe^{59} の増加は幼若並びに老朽赤血球に認められ前者が特に著明であつた．

Ⅳ. 総括並びに考按

著者は第1，2編において Miller ら[13]及び Grinstein ら[14]に反論して種々検討した結果，赤血球内 E S Fe の存在することを結論づけたが今回は Starch block electrophoresis によつて血色素を

Fig. 6. Transitional curves of specific activities of hemoglobin original solution and each fraction eluates.



After Intravenous Administration of Fe^{59}

分劃し globin 変性の面から E S Fe の本態を追求した.

澱粉を支持体とするzone electrophoresis は, 1954年に Kunkel が原法を報告[2]したがその特性は, 1) 極めて良好な分離法を有する. 2) 泳動後に試料を回収して諸種検査に供することができる. 3) 比較的多量の試料を扱いうるので鮮明な泳動像を肉眼で観察できるとともに微量抽出の測定の場合に有利であるなどの点にある.

さて本法による家兎の血色素泳動像には, I, II, IIIの各分劃を認めた. その分離の状態は Kunkel[6] が正常成人血色素 (Hb A) 泳動像で観察報告したものとほぼ同様であり, 1956年第6回国際血液学会に於いてその主泳動部を A_1, 遅

Table 3. E S Fe^{59}/Hb Fe^{59} ratio of hemoglobin original solution and each fraction eluates.

No. 1

ESFe \ times	3	6	9	12	24	48	96hrs	1	2	3	4	5	6w
	%												
Oria.	3.6	3.1	2.8	3.0	2.7	2.5	2.2	2.8	3.0	3.1	3.1	3.2	3.6
I	2.7	3.0	3.6	3.1	3.3	3.5	3.2	3.0	3.2	3.6	3.3	3.6	3.1
II	3.0	2.8	3.2	3.5	3.0	2.9	2.7	3.5	3.6	4.4	2.6	4.3	4.2
III	15.9	16.7	6.6	11.8	9.6	8.4	7.5	7.0	4.1	1.8	6.0	7.6	6.1

No. 2

ESFe \ times	3	6	9	12	24	48	96hrs	1	2	4	6 w
	%										
Orig.	3.4	3.5	3.4	3.3	3.3	3.2	3.6	2.4	3.5	3.2	4.2
I	3.5	3.4	3.3	3.2	3.7	3.9	3.2	3.3	3.2	3.1	3.6
II	2.8	3.2	3.2	3.5	3.4	3.2	2.9	3.5	3.0	3.3	5.5
III	10.0	9.9	8.7	5.1	6.2	7.2	4.1	5.4	6.0	7.9	10.1

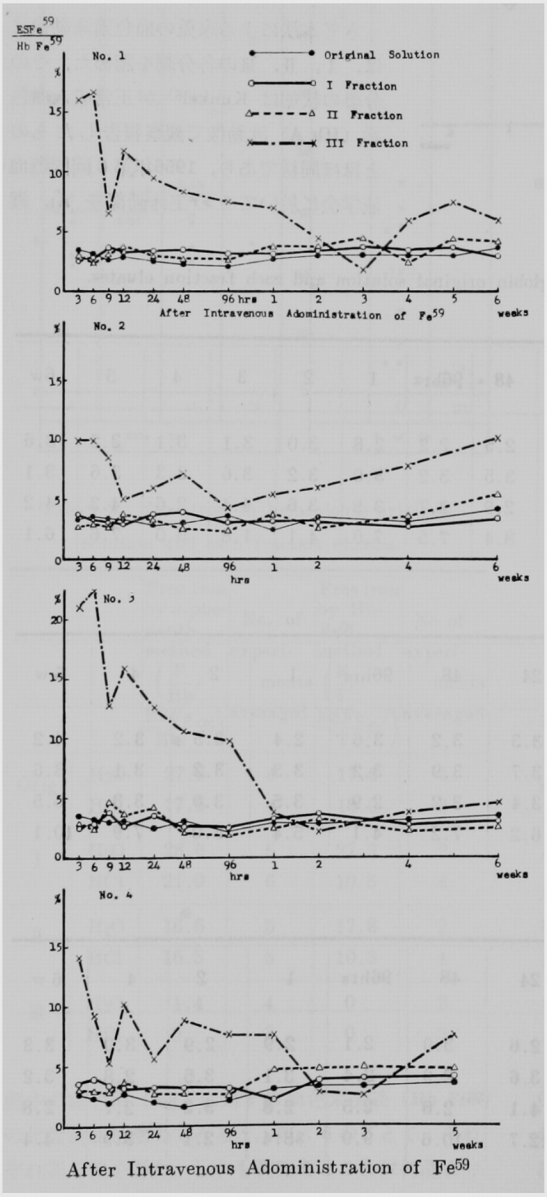
No. 3

ESFe \ times	3	6	9	12	24	48	96hrs	1	2	4	6 w
	%										
Orig.	3.4	3.3	3.0	3.2	2.6	3.0	2.1	2.9	2.9	3.0	3.3
I	2.7	3.0	3.8	3.2	3.6	2.9	2.4	3.1	3.5	2.8	3.2
II	2.8	3.0	4.5	3.7	4.1	2.6	2.5	2.8	3.3	2.7	2.8
III	21.2	22.6	12.8	15.8	12.7	10.6	9.9	3.4	2.1	3.9	4.4

No. 4

times / ESFe	3	6	9	12	24	48	96 hrs	1	2	3	5w
Orig.	3.0 %	2.7	2.2	2.8	2.2	1.6	2.1	3.2	3.3	3.3	3.6
I	3.4	2.9	3.2	3.1	3.3	3.2	2.9	2.2	3.4	3.9	3.9
II	3.3	3.3	3.1	3.3	2.8	3.1	2.7	4.8	4.5	4.9	4.6
III	14.2	9.3	5.1	10.6	5.5	8.8	7.8	7.6	3.2	2.6	7.5

Fig. 7. Transitional curves of E S Fe^{59}/Hb Fe^{59} ratio in hemoglobin original solution and each fraction eluates.



れて移動する小分屑を A_2, A_1 に接してこれに先行する分屑を A_3 と名づけられたが，家兎血色素のI，II，III分劃は人血色素の A_1, A_2, A_3, にそれぞれ匹敵するものと考えてよい．

次にIII分劃の血色素量は全体の1.9％に過ぎなかつたが E S Fe 量比は他の分劃にくらべ著しく多かつたのは注目に価する．III分劃，即ちI分劃より移動速度が速い血色素成分で正常人の HbA_3 に匹敵するものについては，その本態は殆んど知られていない．Kunkel and Bearn[15] は放射性鉄を用いて研究し，Hb A の最初の崩壊産物であろうと推定し，Schlegel ら[16] も intravitally aged cell よりの溶血液をつくり Agar electrophoresis を行なつた結果からその可能性を支持している．著者の実験でIII分劃に E S Fe が多く認められたことはそれを証拠づけるもので興味深い．更に遊離鉄がI，II分劃には含まれてもIII分劃に殆んど存在を認めなかつたことはIII分劃中には E S Feを多量に含むが，それは遊離鉄ではなく，血色素の構造をもち塩酸により鉄を比較的容易に分離する Barkan, G.[17] のいわゆる E S Fe の範疇に属するものが大部分存在することを実証するものである．

そこでこの分劃の特異性を更に明確にする為に放射性鉄を用いて各血色素分劃の比放射能を経時的に観察したところ，それぞれ異る値を示した．このことは Schapira, G.[18] が比放射能の相違は血色素の異種性を示すものであるとし，その鑑別に用いていることからも明らかなごとく各分劃中の血色素はそれぞれ異種性のものであることを示している．特にIII分劃は明らかに他の

分劃の比放射能とはつきり異る値を示し，しかも初期より第3週まではⅢ分劃の比放射能は原液，Ⅰ，Ⅱ分劃のそれより低値であるが，第4週以後では却つて高値であることは初期のⅢ分劃と後期のそれとは，ほぼ同一の泳動速度を示すにもかかわらず明らかに異種のものと考えざるを得ない．

最後に4例の瀉血貧血家兎を用いて Fe^{59} 標識血色素の電気泳動を行ない経時的に各血色素分劃のＥＳFe^{59} の変動を追求したところ，Ⅲ分劃におけるＥＳFe^{59} の増加は Fe^{59} 液投与後の初期と4週以後に明らかに認められた．つまり初期におけるⅢ分劃のＥＳFe^{59} の増加は第2編で明らかにした幼若赤血球中に生成された血色素が速かに分解する傾向を示すそれに一致し，成熟赤血球の血色素とは globin の性状において異る血色素が生成される結果である．最近小林ら[19]は寒天ゲル電気泳動法により新生赤血球に Hb F（臍帯血）とは異るが Hb F と機能的な類似性をもつものが高率に出現すると述べ，鈴木[5]は新生児 Hb の A_3 に Hb F を高濃度に認めこれを $Hb\ F_3$ としている．我々[20]も臍帯血の電気泳動でⅢ分劃に非常に高値のＥＳFe 量の存在を確認している点などから考えて幼若赤血球の血色素異種性と Hb F との関連は興味あるところで今後の研究にまちたい．

一方4週後の血色素におけるⅢ分劃のＥＳFe の増加は3週までの比放射能の相違より初期の血色素と性状を異にし，家兎赤血球の寿命[21]から考えて第1編でのべたごとく赤血球老化に伴うＥＳFe 移行の血色素と考えるべきである．

Ⅴ．結　　論

ＥＳFe 本態の一端を解明するために Starch block electrophoresis で家兎血色素の分離を行ない，次の結論を得た．

1）starch block electrophoresis により家兎血色素はⅠ，Ⅱ，Ⅲ分劃に分離され，その泳動速度より成人血色素の Hb A_1，A_2，A_3，にそれぞれ相当することを認めた．

2）ＥＳFe はより泳度の速いⅢ分劃にもつとも多く認められ，反対に遊離鉄は他の分劃とくらべ少なく殆んど存在しなかつた．

3）Fe^{59} 標識血色素液についての各分劃中の血色素の比放射能を検討した結果，Ⅲ分劃の血色素は他の分劃のそれとは異種性であることを認め，更に幼若期のⅢ分劃血色素の性状と老朽期のそれとは明らかに異るものであつた．

4）赤血球年令に伴う血色素各分劃のＥＳFe^{59} の消長を観察した結果Ⅲ分劃中のＥＳFe^{59} のみが赤血球の幼若並びに老朽期に著明に増量することが明らかとなつた．

5）従つてⅢ分劃中の血色素 globin は生成時及び老朽期にその性状を成熟血色素のそれと異にしその結果が血色素の崩壊を早め，ＥＳFe の生成を増加するに至つたものと思われる．

引　用　文　献

1) 小坂：日消会誌，48，6（昭26）
2) Kunkel, H. G.: Methods of Biochemical Analysis, 1, 141 (1954).
3) Singer, K., Chernoff, A. J. and Singer, L.: Blood, 6, 413 (1951).
4) 福武，高橋，藤巻：臨床病理，特 (2), 117 (1955).
5) 鈴木：日血会誌，22，626（昭34）.
6) Kuukel, H. G. and Wallenius, G.: Science, 122, 288 (1955).
7) 福武，鈴木：臨床病理，7，167（昭34）.
8) 中村：生物物理化学，3，58 (1956).
9) Barkan, G. and Walker, B. S.: J. biol. Chem. 135, 37 (1940).
10) 木戸：医学研究，25，1253（昭30）.
11) Masri, M. S., Josephson, A. M. and Singer, K.: Blood, 13, 533 (1958).
12) 湯浅：医学研究，24，1353（昭29）.
13) Miller, L. L. and Hahn, P. F.: J. biol. Chem. 134, 586 (1940).
14) Grinstein, M. and Moore, C. V.: J. Clin. Invest., 28, 505 (1949).
15) Knnkel, H. G. and Bearn, A. G.: Fed. Proc. 16, 760 (1957).
16) Schlegel, B., Bräun, H. and Müller, A. A.: Klin. Wschr., 37, 586 (1959).
17) Barkan, G.: Z. physiol. Chem., 148, 124 (1925), 171, 179 (1927).
18) Schapira, G. J., Dreyfus, C. and Kruh, J.: In, Ciba Symposium Porphyrin Biosynthese and Metabolism, edited by G. W. Wolstenholme and E. C. P. Millar. London: Churchill, (1955) PP. 156—170.

19) 小林ら：日血会誌：25, 579 (昭37).
20) 小林：日血会誌：24, 643 (昭36).
21) 田村：岡山医誌：71, 8343 (昭34).

Studies on Easily Split Off Blood Iron by Radioactive Iron

Part 3, Electrophoretic Behaviors of Easily Split Off Blood Iron

By

Hiroshi TABUCHI

Depertment of Internal Medicine Okayama University Medical School

(Director . Prof. Kiyowo Kosaka)

For the purpose of clarifying the significance of E S Fe, starch block electrophoresis of rabbit hemoglobin was been carried out and the following results were obtained.

1. The hemoglobin was separated in three fractions, I, II and III.

In the migration distances, these fractions corresponded to Hemoglobin A_1, A_2 and A_3 of adult hemoglobin respectively.

2. E S Fe was detected most in the fraction III (largest at mobility), while free iron in that fraction was less than the other fractions.

3. In estimating the ratio of Fe^{59}-radioactivity to hemoglobin volume (mg) of the Fe^{59} labeled hemoglobin solution in the each fraction eluate, it was noticed that the specific activity of the fraction III was less than those of others during 3 weeks after the administration of Fe^{59}, followed by a significant increase after 6 weeks. It was thought from the above that the hemoglobin in fraction III different from that in the other fractions, and that in the early stage was different from that in the later one.

4. The ratio of radioactivities in easily split off iron to that in hemoglobin iron of the same samples as the above increased markedly in the fraction III in the early stage, followed by a gradual decrease during 2 weeks and again a tendency of increase at 4 weeks later in the same fraction.

5. It was indicated from these results that the characters of the globin in new formed hemoglobin and aged one were different from that in mature one, and that this difference in the characters was resulted in an increase of E S Fe due to hemoglobin degradation.