

# 温泉医学領域に於ける濾紙分析法の研究

## (1) 濾紙電気泳動法並びに濾紙 chromatography による血清鉄の研究

岡山大学温泉研究所(指導:森永 寛教授)

### 石 橋 丸 応

#### 目 次

##### 緒 言

##### I. 濾紙電気泳動法による血清鉄の研究

1. 原理
2. 試薬及び装置
3. 操作
4. 成績並びに考察
5. 結論

##### II. Paper chromatography 並びに濾紙電気

泳動法による血清鉄の一新定量法

1. 原理
2. 試薬及び装置
3. 標準曲線の作り方
4. 実施

##### a) Paper chromatography

##### b) 濾紙電気泳動法

##### c) 定量法

##### 5. 基礎的条件の検討

##### 6. 考察

##### 7. 結論

##### III. 放射能泉入浴並びに緑ばん泉飲用の血清鉄に及ぼす影響

1. 実験材料並びに実験方法
2. 実験成績
3. 考察
4. 結論

#### 文 献

##### 緒 言

血清中に鉄が存在していることは1900年頃より Abderhalden らによつて知られていたが、この鉄が血清蛋白のどの部分に、またどんな状態で結合しているか不明であつた。

Cohn らはアルコールで血漿分画法をおこない IV-7 の分画、すなわち、 $\beta_1$ -globulin に金属結合の性質があることを証明し<sup>1)</sup>、1946 年 Shade<sup>2)</sup> によつて Siderophilin と命名され、ついで 1948 年 Surgenor et al. によつて結晶状にとり出された。

1953 年 Horst ら<sup>4)</sup> は放射性 Fe<sup>59</sup> を与え、

濾紙電気泳動を行い放射能を測定し、 $\beta_1$  に結合していることを証明している。

1957 年、妹尾教授等<sup>5)</sup> は血清鉄結合能の最大値をしらべるために硫酸第二鉄アンモニン溶液 (10mg Fe/ml) を与え、濾紙電気泳動を行つた所、鉄は血清蛋白の  $\alpha_2$ 、 $\beta_1$  及び  $\beta_2$ -globulin 分割に見出されたと述べている。

又、血清鉄の比色定量には、O-phenanthroline や  $\alpha$ - $\alpha'$  dipyridyl<sup>6)7)8)9)</sup> 法等の数多くの報告があるが、血清試料が少なくとも 2 ml 必要で、実施にあたつて中々手間がかかる。

近年、濾紙-chromatography 並びに濾紙電

気泳動法で微量金属イオンを分離検出しようとする試みが行はれ, Lederer<sup>10)</sup>, Mc Donald<sup>11)</sup>, 安永<sup>12)</sup>, 仲野<sup>13)</sup>, 大原<sup>14)</sup>, 牧<sup>15)</sup>, 原沢<sup>16)</sup> 等の報告があるが, 定量に関する報文は割合に少い。特に血清鉄の濾紙分析による定量法はみあたらない様である。

著者は、さきに鳥居ら (1955)<sup>17)18)</sup> の発表した高感度の、鉄およびコバルトの発色試薬である O-nitrosoresorcin monomethyl ether (p-methoxy benzoquinone monoxime) を使用し、濾紙電気泳動法で血清中の鉄は血清蛋白分層の  $\beta$ -globulin 分割に結合していることを濾紙上で証明し、更に著者考案による特殊な paper chromatography で血清鉄の定量法を案出したので報告する。更に本法を使用し、放射能泉入浴並びに緑ばん泉飲用の血清鉄に及ぼす影響について報告する。

### I. 濾紙電気泳動法による血清鉄の研究。

#### 1. 原理

血清の濾紙電気泳動をおこない乾燥固定し、これは 20% Hydroxylamine hydrochloride を Spray し  $Fe^{+++}$  を  $Fe^{++}$  に還元し、O-nitrosoresorcin monomethyl ether をさらに Spray し発色させ、他の泳動は B. P. B または Amidoschwarz 10 B で血清蛋白分層を染出し相互を比較する。

#### 2. 試薬及び装置

- 1) 装置は小林式濾紙電気泳動装置<sup>19)20)</sup>
- 2) 水は再蒸溜水を使用する
- 3) Veronal 緩衝液  
pH 8.6 で Veronal-Na は Merck 製のもの  
Veronal-Na  
(sodium diethyl barbiturate) 10.3g  
Veronal

(diethyl barbituric acid) 1.84g  
Aq. dest. にて 1000 ml とする。

4) 20% Hydroxylamine hydrochloride

5) O-nitrosoresorcin monomethyl ether

(東京化成) 鮫和水溶液

これは一度濾過して使用する、溶解度は 40.2 mg/100 ml (18°C) で水溶液は 20°C 以下の室温で数週間安定であるが、30°C前後では 3 日後に分解がみられるという<sup>17)</sup>.

#### 6) 蛋白染色液

Bromphenol blue (B. P. B) 0.5g

昇 水 10.0g

冰 醋 酸 20.0c.c.

Aq. dest. にて 1000 ml. とす。

#### 7) 標準鉄液

石津特級硫酸第一鉄アンモニウム 140 mg を再蒸溜酢酸 2.5 ml を含む再蒸溜水にて溶解し 100ml とす。更にこれから 1 ml 中  $Fe^{++}$  1 mg の標準液を作り、使用の都度適宜の濃度に稀釀する。

#### 8) ガラス器具

Paper chromatography 用 Spray 2 口、およびミクロピペット数本

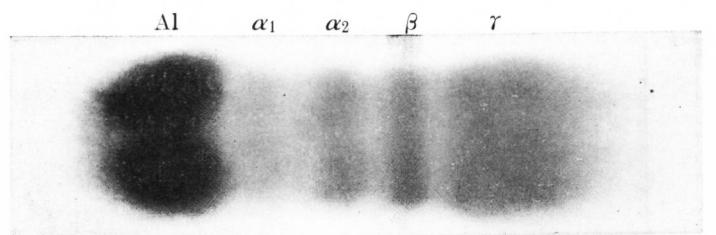
#### 9) 濾紙

東洋濾紙 No. 51, 12 cm × 24 cm

#### 3. 操作

食前空腹時のヒトの血清を材料とした。血清は溶血を防いでよく分離したものをもちいた。血清 1 ml を 2 分し (b), (c) とし (b) は血清そのまゝ、(c) は 20% Hydroxylamine hydrochloride 0.2 ml、および O-nitrosoresorcin monomethyl ether 鮫和液 0.3 ml をくわえ発色させ 30 分後、試料とした。対照としては標準鉄液 0.5 ml. に (c) と同様に発色させて試料 (e) とした。また標準鉄液に試薬をくわえずに試料 (d) とした。

- Fig. 1. a: Electrophoretic pattern of serum protein fraction, stained with B.P.B.  
b: Electrophoretic pattern of serum iron obtained by spraying the reagent  
after electrophoresis (serum iron).  
c: The same, obtained by adding the reagent before electrophoresis (serum  
iron).  
d: Electrophoretic pattern of iron obtained by spraying the reagent after  
electrophoresis (standard iron).  
e: The same, obtained by adding the reagent before electrophoresis (stan-  
dard iron).



( a )

( b )

( c )

( d )

( e )

つぎに Fig 1 のように原点（濾紙の端から 1.5 cm のところ）に (b), (c), (d), 及び (e) を 0.04 ml 宛、又血清蛋白分層を検するために (a) の部に同一の血清 0.01 ml を塗抹後、室温 20°C で上記の濾紙 1 枚について 200V, 7—9 mA. 定電流にて 5—7 時間泳動せしめ Albumin 分割が原点から 7—8 cm 移動した所で泳動を終つた。

つぎに濾紙を約 100°C で 20 分間乾燥後、(a) の部位は B. P. B または Amidoschwarz 10 B で蛋白を染色する。 (b) および (d) は 20% Hydroxylamine hydrochloride を Spray し 10 分間放置後、更に O-nitrosoresocin monomethyl ether を Spray する。必要な場合は PH 3.8 の Acetate buffer を Spray する。

#### 4. 成績並びに考察。

Fig 1 に示す通り、泳動後発色させた場合、即ち (b) は (a) の  $\beta$ -globulin の位置に相当する部分に淡緑色の Spot が現われ、明らかに鉄は  $\beta$ -globulin に結合していることがわかつた。

泳動前に発色させ試料とした場合には、その Spot は (c) の如く  $\alpha_1$  と  $\alpha_2$ -globulin の略々中間の位置に泳動した。

標準鉄を泳動前に発色せしめて後泳動した場合は Fig 1 の (e) の如くで (c) の血清鉄と同じ位置に主たる Spot が認められた。この (e) の場合には Albumin 分割よりも左方に泳動した淡黄緑色の Spot とならびに原点附近に淡橙色の Spot とが認められた。前者は過剰の発色試薬と考えられ、後者は O-nitrosoresocin monomethyl ether 中の分解した不純物によるものと考えられるが確認していない。

標準鉄を泳動後発色させたものは (d) の如

くで鉄の Spot はほとんど動かず原点附近にとどまつた。

鉄の有機発色試薬としては O-phenanthroline,  $\alpha$ - $\alpha'$  Dipyridyl, Disodium-1, 2 dihydroxy benzen-3, 5-disulfonat, 8-Hydroxquinoline, Dimethylglyoxime, Salicylic acid, 等があり、特に  $\alpha$ - $\alpha'$  Dipyridyl, O-phenanthroline が血清鉄測定の場合の発色試薬として使用されているが、濾紙電気泳動に用うる試料の量として適当なのはせいぜい 0.1 ml 程度迄であるため前記のような試薬では感度の点からして鉄の発色は困難であろう。

$\alpha$ - $\alpha'$  dipyridyl, O-phenanthroline より 3 倍ないし 10 倍感度がよい<sup>17)</sup>といわれる O-nitrosoresocin monomethyl ether を使用すると血清中の鉄は Fig. 1 の様に緑色に発色する。而して血清蛋白分層の泳動像と比較すると血清鉄の Spot は  $\beta$ -globulin 分割に一致して認められるものである。

血清蛋白の泳動を行つて後に鉄を発色させた場合その Spot は  $\beta$ -globulin 分割に一致して現われるが、緑色がうすく泳動前に発色させて濾紙電気泳動をおこなうと鉄は鮮明な緑色を呈するが Spot の位置は  $\beta$ -globulin 分割のところではなくて  $\alpha_1$  と  $\alpha_2$ -globulin 分割との略々中間に現われる。この差異を生じた原因としては泳動前に試薬をくわえて発色した場合は  $Fe^{+++} \rightarrow Fe^{++}$  となり、さらに O-nitrosoresocin monomethyl ether と結合して新たな錯塩を生じ之は前者、即ち  $Fe^{+++}\cdot\beta$ -globulin との泳動値が異なるためと推定される。

この試薬は前述の如く非常に感度がよいので濾紙上に附着している微量の鉄も発色する場合があるが濾紙附着の鉄か否かは一見してわかる。O-nitrosoresocin monomethyl ether

の Spray が多いと濾紙全体が淡緑色をおびるので注意を要する。

$\beta$ -globulin 分割結合の鉄は発色後、時間経過と共に不鮮明になるので定量には応用困難と考えられる。

## 5. 結論

著者は鉄の有機発色試薬たる O-nitrosoresorcin monomethyl ether を用い濾紙電気泳動法で血清鉄は血清蛋白分屑の  $\beta$ -globulin 分割に結合していることを証明した。

## II. Paper chromatography 並びに濾紙電気泳動法による血清鉄の一新定量法。

### 1. 原理

血清 0.5 ml に 20%  $HNO_3$  を加え、鉄- $\beta$ -globulin を分解し、濾過し濾液を Acetate buffer で pH 3.8 とし 20% Hydroxylamine hydrochloride で  $Fe^{+++}$  を  $Fe^{++}$  となし、O-nitrosoresorcin monomethyl ether (以下 N. R. M. E. と記す) で緑色に発色させ四塩化炭素で過剰の試薬をのぞき、水層を試料として 90% Ethylalcohol を展開液とする著者考案の Paper chromatography をおこない Densitometer で緑色 Spot の吸光度を求め定量する。

又上記の緑色水層を試料として Sörensen の磷酸緩衝液 pH 7.5 を使用して泳動し緑色 Spot の吸光度を Densitometer で求め定量する。

### 2. 試薬及び装置

#### 1) O-nitrosoresorcin monom ethylether 飽和溶液<sup>17)</sup>

東京化成製の本試薬を再蒸溜水にて飽和溶液とし東洋濾紙 No. 5A で濾過して使用する。溶解度は 40.2 mg/100 ml (18°C) で水溶液は 20°C 以下の室温で数週間安定である。

#### 2) 鉄標準溶液

1 ml 中 1 mg 含有のもの (第一化学発売)

#### 3) Acetate buffer (pH 3.8)

0.5 M の酢酸 8 容と 0.5 M の酢酸ソーダ 1 容を混合し、Dithizone 四塩化炭素溶液にて重金属をのぞき精製する。

#### 4) 20% Hydroxylamin hydrochloride 溶液

石津特級 20 g を再蒸溜水に溶解、100 ml とし Dithizone 四塩化炭素溶液にて精製する。

#### 5) 四塩化炭素

特級品を再蒸溜して使用する、留出温度 77°C のもの。

#### 6) 90% Ethylalcohol

石津特級 99.5v% Ethylalcohol 90 ml に再蒸溜水 9.5 ml を加える。

#### 7) 飽和酢酸ソーダ液

$CH_3COONa \cdot 3H_2O$  (特級関東化学) 60 g に再蒸溜水 100 ml を加え加温溶解後放冷して上層液を使用する。

#### 8) 20% $HNO_3$

特級  $HNO_3$  を再蒸溜したもの 20 % となす。

#### 9) Paper chromatography 装置

Fig. 2 の如く東洋濾紙 C 号器の分液ロート及びふたを取つたものを使用した。

#### 10) 濾紙電気泳動装置並びに Densitometer.

小林式濾紙電気泳動装置と小林式濾紙光電光度計 (夏目製作所) を使用した。

#### 11) 濾紙

東洋濾紙 No. 51 または No. 50 の 2 × 40 cm 及び No. 51 の 12 × 24 cm.

#### 12) ピペット

血糖用ピペット数本。

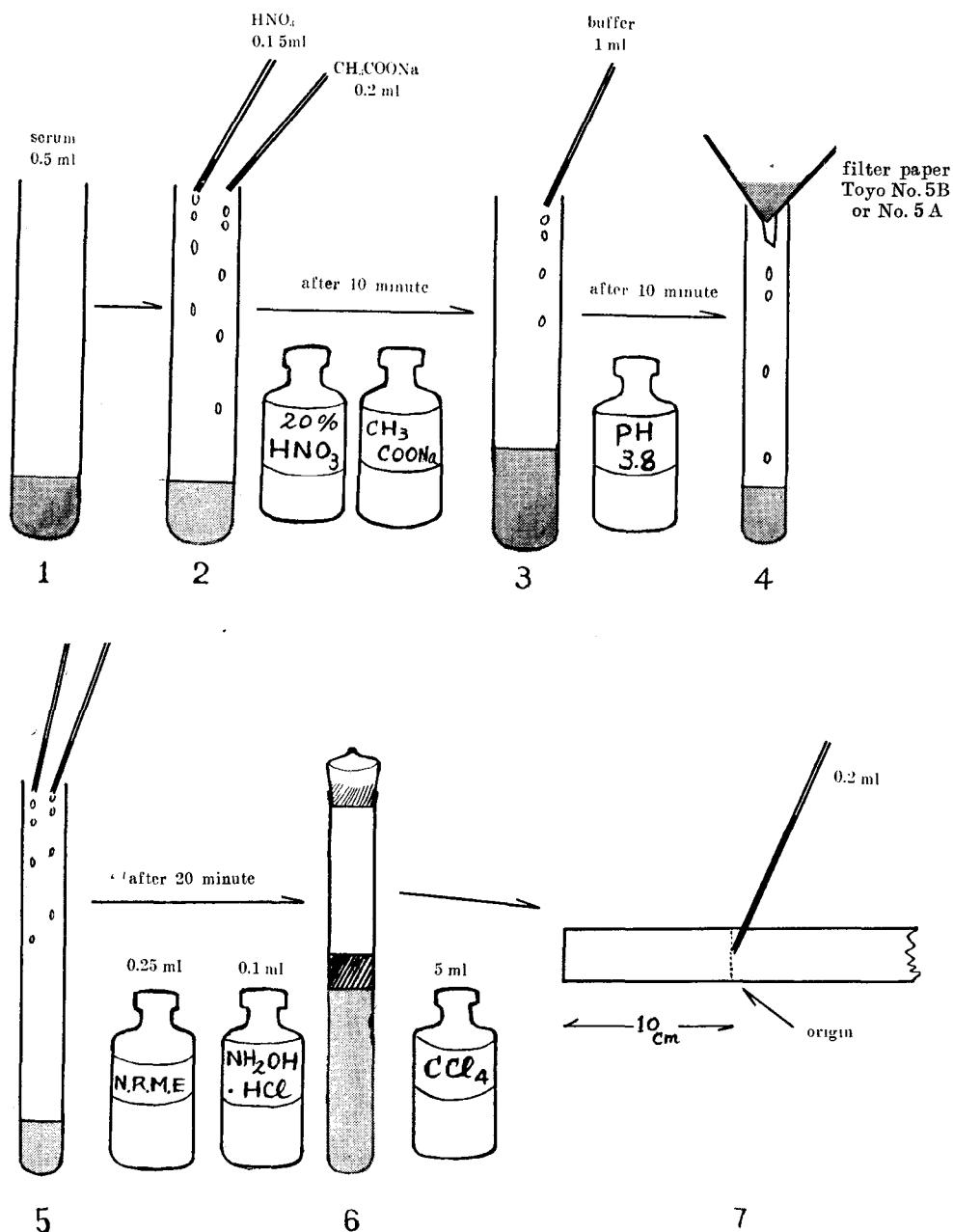
### 3. 標準曲線の作り方

標準溶液 ( $1 \text{ mg/ml}$ )  $1 \text{ ml}$  を  $100 \text{ ml}$  のメスコルベンにとり、鉄不含蒸溜水をくわえて目盛までみたす。( $1 \text{ mg}/100 \text{ ml}$ )

これを  $0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0 \text{ ml}$  宛とり、

更に水をくわえて  $10 \text{ ml}$  とする。これは夫々鉄の  $50, 100, 150, 200, 250, 300 \text{ mg}/100 \text{ ml}$  に相当する。これらについて血清の場合と同様に操作して Fig. 5 を得た。

Fig. 3. Procedure



#### 4. 実 施

小試験管に血清 0.5 ml を取り 20% HNO<sub>3</sub> 0.15 ml をくわえ、よく混合して 20 分間放置する。次に飽和酢酸ソーダ 0.2 ml を加え振とうし、更に pH 3.8 の酢酸緩衝液 1 ml を加え 10 分間放置後、東洋濾紙 No. 5 A で濾過する。

この濾液を共栓すり合せ試験管（内径 1.2 cm、高さ 15 cm）に取り 20% Hydroxylamine hydrochloride 0.2 ml 更に N. R. M. E. 0.25 ml を加え 20 分間放置後、約 5 ml の四塩化炭素を加え振とうして過剰の N. R. M. E. を除く。上清の緑色水層 0.2 ml を Paper chromatography 及び濾紙電気泳動の試料とする。(Fig. 3)。

Paper chromatography の一般的方法<sup>21)22)23)</sup>は濾紙の一端に微量の試料を塗布し、密閉容器中で濾紙に溶媒（展開溶媒）を飽和させた後、展開し乾燥して発色試薬を Spray して分別帶の位置を見出して分離の目的を果すのであるが、著者の場合は溶液の状態で発色させ試料として展開させる方法である。

装置は東洋濾紙製 C 号型をもちいて上部の分液ロートおよびすり合せのふたを取り去った円筒だけを使用する。(Fig. 2)

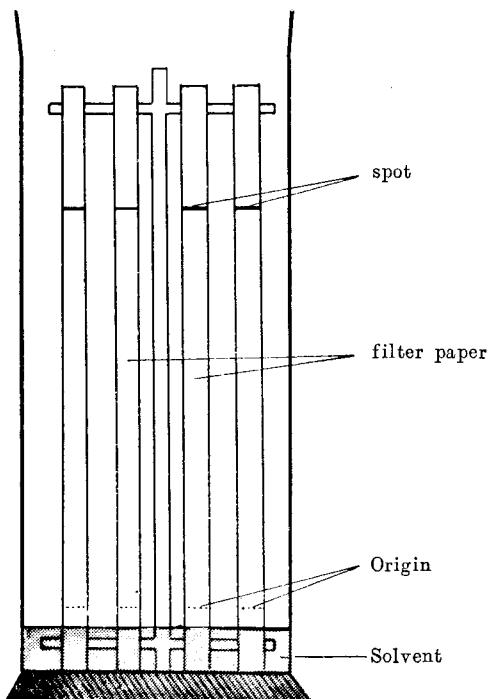
濾紙は東洋濾紙 No. 51 または No. 50 をもちい溶媒は 90% Ethylalcohol で展開する。

(著者の実験温度は室温 23—27°C であるが、20°C 前後の恒温装置で行うとよい)

試料は血糖用ピペットで 0.1 ml ずつ 2 回つける。多量の試料をつけるために濾紙の端より 10 cm の所を原点とする。No. 50 は No. 51 に比較して試料の拡がりが少ない。試料を拡げないために電熱器の上で加温しながら塗布してもよい。

試料をつけた後電熱器で酢酸臭がなくなる

Fig. 2. Apparatus for paper chromatography to measure serum iron.



まで充分乾燥する。つぎに装置に入れて展開する。濾紙に試料をつけたときはほとんど無色でわからないが、展開が進むにつれて溶媒の先端に緑色の Spot が線状になってくる。大体 4—6 時間展開すると原点より 12—16 cm に Spot が線状に集まるから取出して風乾する。

##### b) 濾紙電気泳動法

小林式濾紙泳動装置を使用し、濾紙は東洋濾紙 No. 51 12 × 24 cm で 1 枚について 15 mA の定電流で泳動する。試料は 0.2 ml 級、2 ケ所につける。緩衝液は Sörensen の磷酸緩衝液 pH 7.5 を使用する。

試料の塗布は Fig. 7 の如く (—) 極より 3 cm の所とする。4—6 時間泳動して緑色 Spot が 5—7 cm 動いた所で取出し風乾する。

##### c) 定量法

濾紙を完全に風乾後、100°C に溶ゆうした

パラフィン中に通じて濾紙を半透明にし、小林式濾紙光電度計でフィルター 650 m $\mu$  (夏目製作所製) を使用し、Paper chromatography の場合は吸光度の最高値をもとめ、濾紙電気泳動法による場合は Spot の吸光度の和をもとめ標準グラフと比較して定量する。

Fig. 4. Absorption curves

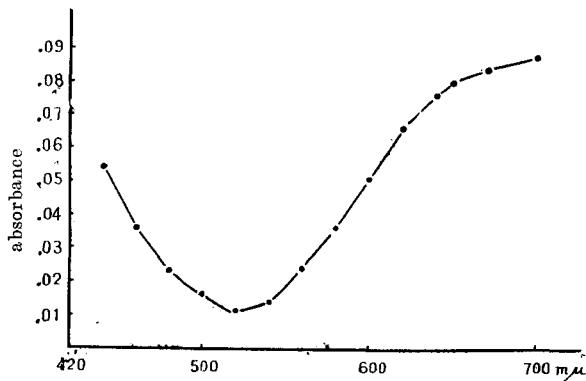


Table 1 Variation in optical density.

Day	50	100	150	200	250	300	Fe $\gamma$ /100ml
1	.022	.035	.043	.054	.065	.080	
2	.022	.035	.042	.054	.066	.080	
3	.022	.034	.043	.054	.066	.080	
4	.021	.033	.041	.052	.066	.078	
10	.016	.028	.034	.047	.060	.071	

吸光度は 6 時間以内であれば安定であるが、それ以後は遂次吸光度を減ずると報告している。

著者の実験ではパラフィン中に通じた濾紙上の Spot は日光を遮断して保存すれば Table 1 の通り、3 日目までは安定であるが、その後は遂次吸光度を減ずるので 3 日以内に測定することが望ましい。

### 3) 標準グラフ並びに再現性

Fig. 5 に示す通り Paper chromatography による標準液の吸光度は 50—250  $\gamma$ /100 ml では直線になり、300  $\gamma$ /100ml ではたわみ曲

線となる。然し濾紙電気泳動の場合は吸光度が低いので同試料を 2 枚泳動し Densitometer で定量する時 Spot が重なる様に濾紙を 2 枚重ねて測定することが必要である。

### 5. 基礎的条件の検討

#### 1) 吸収曲線

島津 QR-50 型光電分光光度計で緑色 Spot の吸収スペクトルを取つてみると Fig. 4 の如く 700 m $\mu$  に最大吸収を有する。したがつて吸光度測定にはフィルタ-700 m $\mu$  が最適であるが、濾紙光度計用干渉フィルターが発売されていないので 650 m $\mu$  を使用した。

#### 2) 錫塩緑色 Spot の安定度

鳥居博士<sup>17)</sup>は、水溶液中の錫塩の

線となる。

Paper chromatography による各濃度の再現性は Table 2 の如くであり、誤差は 10 % 以内である (50—250  $\gamma$ /100 ml で)

Table. 2 Reprsdicility in measurements of optical density by paper chromatography.

$\gamma$ /100 ml	50	100	150	200	250	300
I	.021	.033	.043	.056	.065	.069
II	.022	.033	.041	.055	.063	.068
III	.022	.035	.043	.054	.065	.080

Fig. 5. Original standard curves for paper chromatography

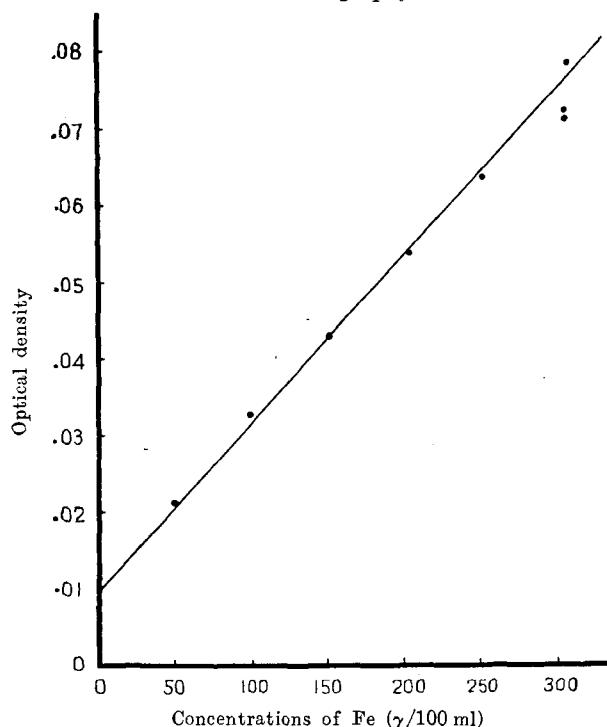
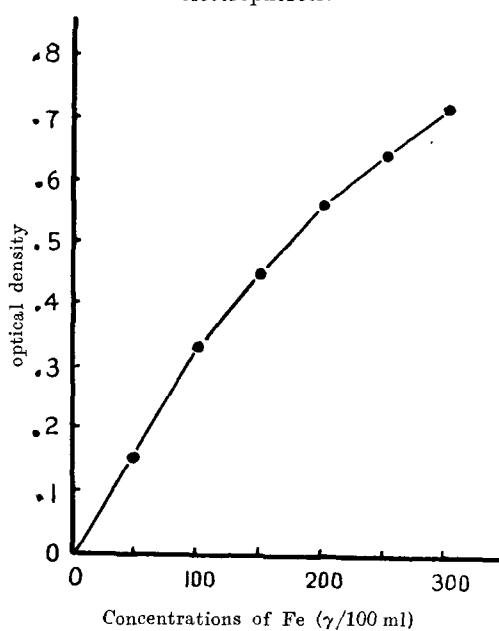


Fig. 6. Calibration curve in paper electrophoresis



#### 4) 回収試験 (Paper chromatography) による

各血清 0.5 ml に 60 γ/100 ml に相当する鉄を負荷し回収試験を行つた所 Table 3 の如く、97—103% で好結果を得た。

#### 5) 測定成績

Paper chromatography による健常人並びに 2, 3 の疾患の血清鉄を測定すると Table 4 に示す通り、梅本、山本法との測定の差は 3 % 以内であつた。

#### 6. 考 察

血清鉄の比色定量法には O-phenanthroline,  $\alpha$ - $\alpha'$  dipyridyl 法等があるが何れも血清試料を 2 ml 以上必要とし、実施に数時間をするきらいがある。

最近、梅本教授、山本学士らは O-nitrosoresorcin monomethyl ether を発色試薬とし

Table. 3 Examination of the recovery rate.  $\gamma/100\text{ml}$ 

Name	Serum iron	Fe add	Measurement values	Fe recovery values	Recovery rate %
Kimura	102	60	160	58	97
Tuboi	52	60	113	61	102
Tateno	23	60	85	62	103
Araya	100	60	160	60	100

Table. 4 Comparison of serum iron values obtained by the Umemoto's method and the author's method.

 $\gamma/100\text{ml}$ 

Name	♀		Disease	Name	♂		Disease
	Umemoto's method	author's method			Umemoto's method	author's method	
O. R.	15	17	Rheumatoid arthritis	T. I.	145	140	Frozen shoulder
R. T.	34	33	Liver cirrhosis	I. H.	126	120	"
S. S.	33	33	Ulcus ventriculi	W. S.	163	158	"
N. H.	56	55	Anemia	T. R.	53	53	Hemiplegia
M. S.	30	27	Anemia	I. M.	94	100	Normal
Y. Y.	80	85	Normal	I. T.	70	70	Normal
				M. O.	107	100	Normal

血清鉄を光電比色計で測定する方法を報告したが、著者はこの N. R. M. E. を発色試薬として著者考案の Paper chromatography で血清鉄の定量法を案出した。更に濾紙電気泳動法も試みたが、濾紙電気泳動法による標準液の検線は Fig. 6 の如くであるが、同一試料を 2 回泳動する必要のあることや、一度に多数の検体を泳動することが困難であるので定量法としてはあまりいい方法と云えない。

Paper chromatography による標準液の検線は Fig. 5 の通りで 50—250  $\gamma/100\text{ml}$  までは直線となるが 300  $\gamma/100\text{ml}$  では曲線となる。これは Spot の線の幅が広くなつたためと考えられる。濃度が大になると Spot の線が広くなるので 2 倍にうすめて 100—200  $\gamma/100\text{ml}$  附近で測定するようにすればよい。

著者は Paper chromatography による血清鉄の定量法につき各方面からの検討を行い、現在行われている血清鉄測定法にくらべその精度に於て遜色のないことを確認し、更に試

料が少量でいいこと（血清 0.5 ml）操作が短時間であること（5 時間）、装置に特殊のものを要せぬこと等の利点から日常の臨床検査に利用しうるものと考える。

著者の Paper chromatography による測定法でとくに注意すべき点をあげると、

(1). 濾紙は東洋濾紙 No. 50 または No. 51 のどちらか一定のものを使用する。

(2). 試料を塗布後、酢酸臭がなくなるまで電熱器で充分乾燥し、東洋濾紙 C 号型の“ふた”をとつて展開する。

(3). 緑色の Spot は溶媒の先端の所に集り 10—14 cm まで溶媒が上昇すると Spot が線状となるので展開をやめる。しかし展開距離は常に一定とする必要がある。（著者は原点より 12 cm としている）

(4). 過剰の N. R. M. E. を四塩化炭素で充分のぞく、もし試薬が残つておれば濾紙上の微量の鉄も展開中に発色して誤差を大きくする。

## 7. 結論

Paper chromatography による血清鉄の一新定量法を考案し、濾紙電気泳動法による定量法も検討した。

本法は現在行われている血清鉄定量法にくらべその精度に於て遜色がなく、又血清 0.5 cc の少量でいいこと、装置に特殊のものを必要としない利点から日常の臨床検査に利用しうるものと考える。

### III. 放射能泉入浴並びに緑ばん泉飲用の血清鉄に及ぼす影響。

#### 1. 実験材料並びに実験方法

温泉入浴実験では健常人 4 名を温研泉 42° ~43°C に 10 分間入浴せしめ、前、5、30、60 分の各時間に肘静脈より採血し実験に供した。

緑ばん泉飲用実験では健常人 4 名に Table 10 の如き樋原鉱泉 30 ml ( $Fe^{+++} + Fe^{++}$  として 75 mg) に水を加えて 200 ml となし頓用せしめた。家兎の実験では正常家兎 5 羽について樋原鉱泉 2 ml ( $Fe^{+++} + Fe^{++}$  として 5 mg) をカテーテルで飲用せしめた。

人の実験に於ては、前、1、3、6 時間に肘静脈から採血し、家兎では耳静脈より前、1 ~6 時間に採血し試料とした。

Ferrous gluconate (グルコン F) 服用実験では健常人 5 名に 0.65g ( $Fe^{++}$  として 75mg) を食後頓用せしめ、前、1、3、6 時間に肘静脈より採血し、家兎に於ては正常家兎 4 羽に Ferrous gluconate 0.05 g ( $Fe^{++}$  として 6 mg) を蒸溜水 5 ml に溶解しカテーテルにて服用せしめ、前、1~8 時間に耳静脈より採血し実験に供した。

#### 実験成績

温泉一回入浴では Table 5 に示した如く、

一定の変動はみられなかつた。

Table. 5 Serum iron levels before and after thermal bath.

Name	Sex	Before	5	30	60 minutes
I. M.	♂	97	94	94	95 γ/100ml
T. I.	♂	70	72	72	71
E. M.	♂	100	102	98	101
T. M.	♀	82	84	82	86
Average		87.2	88.0	86.5	88.2

人の緑ばん泉飲用では Table 6 Fig 10 に示した如く、飲用前平均 99 γ/100 ml であつたものが 1 時間が 121 γ/100 ml、3 時間で 201 γ/100 ml で最高値を示し 6 時間でやゝ前値に復し 146 γ/100ml であつた。

Table. 6 Human serum iron levels before and after the internal use of vitriol water "Yanahara".  
γ/100 ml

Name	Sex.	Before	1	3	6 Hours
S. O.	♀	70	136	302	98
K. T.	♀	97	105	160	222
T. T.	♀	130	135	160	147
M. I.	♂	102	110	182	117
Average		99	121	201	146
%		100	129	224	149

Table. 7 Human serum iron levels before and after the internal use of Ferrous gluconate ( $Fe^{++} 75mg$ ).  
γ/100 ml

Name	Sex	Before	1	3	6 Hour
M. I.	♂	112	155	183	180
A. I.	♀	96	110	150	135
H. K.	♀	110	150	132	148
J. Y.	♀	90	115	205	200
A. T.	♀	66	132	170	154
Average		95	132	168	163
Average of %		100	143	185	178

Ferrous gluconate 服用では Table 7, Fig 10 に示した如く、服用前平均 95 γ/100 ml で

Fig. 10. Human serum iron levels before and after the internal use of a vitriol water "Yanahara".

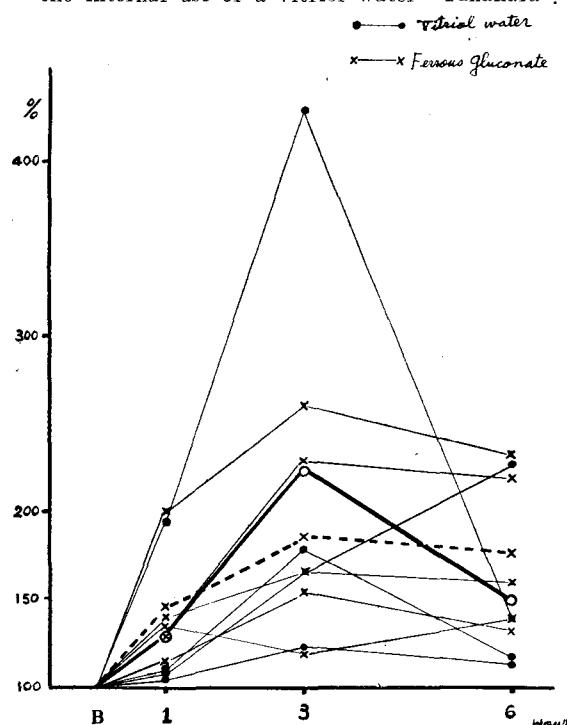


Table. 8 Serum iron levels before and after the internal use of vitriol water "Yanahara" in rabbits  
 $\gamma/100 \text{ ml}$

rabbit No.	Before	1	2	3	4	6
1	182	373		277		205
2	215		273	315	315	
3	227	277			273	
4	205	228		318		
5	130			177		160
Average	192	259		272	294	182

あつたのが、1時間で  $132 \gamma/100 \text{ ml}$ , 3時間で  $168 \gamma/100 \text{ ml}$ , 6時間で  $163 \gamma/100 \text{ ml}$  であつた。家兎の緑ばん泉飲用実験では Table 8, Fig 11 に示した通り飲用前平均  $192 \gamma/100 \text{ ml}$  であつたものが、1時間  $259 \gamma/100 \text{ ml}$  で、3時間では  $272 \gamma/100 \text{ ml}$ , 4時間  $294 \gamma/100 \text{ ml}$ , 6時間で  $182 \gamma/100 \text{ ml}$  で3~4時間が最高値を示した。

家兎の Ferrous gluconate 服用実験では、Table 9, Fig 11 に示した如く前  $148 \gamma/100 \text{ ml}$  で、1時間  $147 \gamma/100 \text{ ml}$ , 3時間では  $165 \gamma/100 \text{ ml}$ , 6時間  $171 \gamma/100 \text{ ml}$  で、8時間では  $150 \gamma/100 \text{ ml}$  であつた。

Fig. 11. Serum iron levels before and after the internal use of a vitriol water "Yanahara" in rabbits

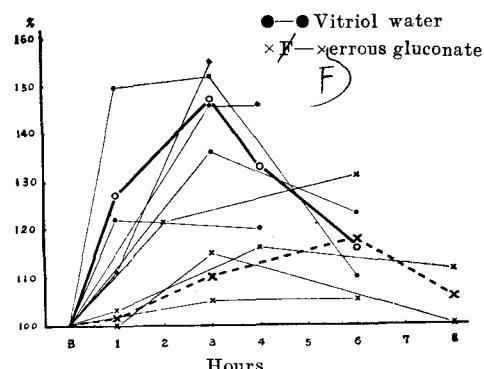


Table. 9 Serum iron levels before and after the internal use of a Ferrous gluconate ( $\text{Fe}^{++} 6 \text{ mg}$ ) in rabbits.  
 $\gamma/100 \text{ ml}$

rabbits No.	Before	1	2	3	4	6	8
6	100	100	127	115			100
7	105					138	
8	180	195			210		200
9	206			215		215	
Average	148	147		165		171	150

Table. 10 Analysis of vitriol water  
"Yanahara". (by M. Mifune)

pH	2.2
Cl <sup>-</sup>	0.045 g/l
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	12.35 g/l
Fe <sup>++</sup> +Fe <sup>+++</sup>	2.5 g/l
Al <sup>+++</sup>	0.0938 g/l
Co <sup>++</sup>	0.0001 g/l ※

※ by author

### 考 察

大島教授等<sup>23)</sup>は緑ばん泉飲用後の血液内の微量元素の動きについて報告している。

著者は本法を使用して緑ばん泉飲用後の血清鉄の変動と Ferrous gluconate 服用後の血清鉄について比較実験した。

大島教授<sup>23)</sup>によれば全血鉄に於て緑ばん泉飲用後、2~6時間で最高値を示したと述べている。著者の実験でも Table 6, Fig 10 に示す如く緑ばん泉飲用の人の実験では、3時間で最高値を示し、Ferrous gluconate 服用実験では Table 7 の如く 3~6 時間で最高値を示した。

家兔の緑ばん泉飲用実験では Table 8, Fig 11 の如くやはり 3 時間で最高値を示し Ferrous gluconate では Table 9 の如く 6 時間で最高値を示した。

大島教授も述べている通り緑ばん泉飲用後の血清鉄の增量は飲用した鉄量に相当するよりはるかに多いのである。Ferrous gluconate に於ても緑ばん泉飲用ほど高値ではないがやはり服用した量より多い。この事は鉄の飲用又は服用によってただちに血清中に現われるのではなく鉱泉飲用の刺戟によって貯蔵鉄が

動員されるものと推定される。

生体中の鉄はその約55%が血色素として、10%はミオグロビンとして存在し、残りの大部分は貯蔵鉄蛋白であるフェリチンの形で貯えられると云われる<sup>24)</sup>。Granich によれば食中の中 Fe<sup>+++</sup> は消化管中で Fe<sup>++</sup> に還元されてから腸粘膜で吸収され、ついで再び Fe<sup>+++</sup> になつてフェリチン中に貯えられ、これは血清蛋白と結合した Fe<sup>+++</sup> と平衡状態を保つていると云われている<sup>25)</sup>。

それで緑ばん泉飲用によって投与された鉄量以上に血清鉄が増加するのはフェリチン Fe<sup>+++</sup> と血清 Fe<sup>+++</sup> の平衡が刺戟によつて一過性にやぶれた結果、Fe<sup>+++</sup> が血清へ移動し血清鉄が増加するのではなかろうか。

### 結 論

1) 岡大温研泉 42°~43°C に10分間1回入浴では血清鉄の変動はみとめられなかつた。

2) 緑ばん泉(樋原鉱泉) 30 ml 飲用によつて血清鉄は平均値で 3~6 時間で最高値を示し Ferrous gluconate 投与群より高値を示した。

3) 緑ばん泉飲用並びに Ferrous gluconate 投与では、投与された鉄に相当する以上に血清鉄は一過性に増加した。

擇筆するに臨み御指導と御校閲とを賜わつた恩師森永寛教授に衷心より感謝の意を表し、御協力をいたゞいた山本学士並びに有益なる御助言をいたゞいた梅本春次教授に御礼申上げる。

(本論文の要旨は日本内科学会中国四国地方会第12回並びに第23回日本温泉気候学会に於て口述し、医学と生物学、44 (3), 45 (4), 1957 に速報した)

### 文 献

- 三浦義彰：医学のあゆみ別集物質代謝(2)，医歯業出版，東京，1955. 164頁。
- Schade, A. L. Caroline, L. : Science. 104; 340, 1946.

- 3) Surgenor, D. M., Kaechlin, B. A. & Strong, L. E.: J. Clin. Invest. **28**; 73, 1948. —医学のあゆみ別集IV. 2: 164, 1955. より引用.
- 4) W. Horst, K. H. Schafer: Klin. Wsch. Jg. 31, Heft 13/14, 340, 1953.
- 5) 妹尾, 粟井, 小河, 小林: 日血会誌, 学会補冊. 3号, 375, 1957.
- 6) Georg Barkan, Burnham S. Walker: J. Biol. Chem., 135; 37, 1940.
- 7) Kitzes, G., Elvehjem, C. A. & Schutt, H. A.: J. Biol. Chem.; 155, 653, 1944.
- 8) 吉川, 紺野: 総合医学, 10; 804, 1953.
- 9) 松原: 日血液誌, 18; 101, 1955.
- 10) Lederer, M: Nature, 167: 864, 1954.
- 11) Mc Donald: Science, 112; 227, 1950.
- 12) 安永, 下村: 薬誌, 74; 62, 66, 1954.
- 13) 仲野: 日化, 73; 912, 1952.
- 14) 大原: 日化, 73; 924, 1952.
- 15) 牧: 分析化学, 3; 39, 1954.
- 16) 原沢: 日化, 74; 862, 1954,
- 17) 鳥居: 日化, 76; 333, 1955.
- 18) 飯村, 鳥居: 分析化学, 4 (3), 1955.
- 19) 小林, 森: 濾紙電気泳動法の実際. 南江堂, 東京, 1956.
- 20) G. E. W. Wolstenholme, Elaine C. P. Millar: Paper electrophoresis, J. and A. Churchill, Ltd., London, 1956.
- 21) 佐竹: クロマトグラフ, 共立, 東京, 1953.
- 22) 桑田: クロマトグラフィー; 広川, 東京, 1954.
- 23) 大島良雄, 芦沢峻: 岡大温研報, 13, 15, 1954.
- 24) Fruton, Simmonds: General Biochemistry, 江上不二夫等訳, 下巻, 東京, 丸善, 1956, 677~695,
- 25) 三浦義彰: 簡明生化学, 東京, 医歯薬出版, 1956,
- 26) 石橋丸応: 医学と生物学, 44(3), 1957; 45 (4), 1957,

### Studies on Paper-Analysis in the Field of Balneology

#### (I) Studies on Iron in Serum by Means of Parper-Electrophoresis and Paper-Chromatography

Maruo ISHIBASHI

Division of Internal Medicine, Balneological Laboratory, Okayama University

1. The author showed by means of paper-electrophoresis using o-nitrosoresorcinolmonomethyl ether (hereafter N. R. M. E.), a colourdeveloping reagent, that iron in serum combines with  $\beta$ -fraction of serum protein.

2. The author proposed a new method for the determination of serum iron by means of paper-chromatography. Procedure is as follows.

In a centrifuged tube, 0.5 ml. of clear serum is taken, acidified with 0.15 ml. of 20%  $HNO_3$ , and allowed to stand for 20 minutes. After addition of 0.2 ml. of saturated solution of  $CH_3COONa$  and 1 ml. of acetic acid-sodium acetate buffer solution ( $pH$ : 3.8), the mixture is kept for at least 10 min. and filtered through Tōyō-filter-paper No. 5 A. The clear filtrate is taken in a stoppered test tube (the inside diameter: 1.2 cm.; height: 15 cm.). To this filtrate are added 0.2 ml. of 20% Hydroxylamine hydrochloride and 0.25 ml. of saturated aqueous solution of N. R. M. E. After being allowed to stand for at least 20 min., the mixture is shaken with 5 ml. of carbon tetrachloride. Then the excess of N. R. M. E. is removed. The supernatant aqueous solution (0.2 ml.) is used for a determination sample. The sample

is placed on the paper (Tōyō-filter-paper No. 51 or 50) in a thin line at a distance of 10 cm. from the edge, and the spots are developed with 90% ethylalcohol. After development for 4—6 hours, a green-coloured linear spot appears at a distance of 12—16 cm. from the origin-point. Spot intensity at 670 m $\mu$  is measured with Natsume's densitometer, and from this, concentration of Fe can be estimated on the standard graph (Fig. 5).

3. Effects of radioactive thermal spring bathing and internal use of vitriol water upon serum iron levels were studied with the results as follows.

The above-mentioned author's method of determining the iron level in a small amount of serum is very convenient in investigating iron metabolism in the field of balneotherapy. The author examined changes of iron levels in serum after radioactive thermal bathing as well as after internal use of acid vitriol water.

a) The iron levels in serum were measured by the author's method before and 5, 30 and 60 minutes after the radioactive thermal bath (Rn-content: 10—30 Mache, 42—3°C., for 10 min.). The iron levels in the serum of healthy subjects showed no significant change after the thermal bathing.

b) Yanahara Mineral Water (an acid vitriol water, pH: 2.2) contains 0.045 gm. of Cl<sup>-</sup>, 12.35 gm. of SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>, 2.5 gm. of Fe<sup>++</sup>+Fe<sup>+++</sup>, 0.0938 gm. of Al<sup>+++</sup> and 0.0001 gm. of Cobalt in one liter.

i) Thirty ml. of Yanahara water diluted with plain water to 290 ml. (Fe<sup>++</sup> content: ca. 75 mg.) and administered to health fasting subjects orally. As a control matter, 0.65 gm. of Glukon-F powder (Fe<sup>++</sup> content: ca. 75 mg.) was then given. Blood samples were taken from the cubital vein before and 1, 3 and 6 hours after the intake of the vitriol water. Iron contents of the serum samples were measured by the author's paper chromatographic method. The results were shown in the table and the figure. The iron contents of the serum after the intake of the mineral water were higher than in the case of the control.

ii) Two ml. of Yanahara vitriol water was administered to rabbits with the aid of a stomach tube, and serum iron levels were determined before and 1, 3, 4 and 6 hours after the administration. An amount of 0.05 gm. of Glukon-F powder was dissolved in 5 ml. of plain water, and this solution was given to rabbits as a control. After the internal use of vitriol water, iron levels in serum rose and remained unexpectedly high for about 1—4 hours, in a manner that did not correspond to the amount of iron in the given mineral water. So that it was suspected that the iron originally contained in the living subjects had been mobilized by the intake of vitriol water. Iron levels in serum after administration of a solution of Glukon-F powder were lower than in the case of the mineral water.

---

Fig. 7. Standard iron (Paper electrophoresis)

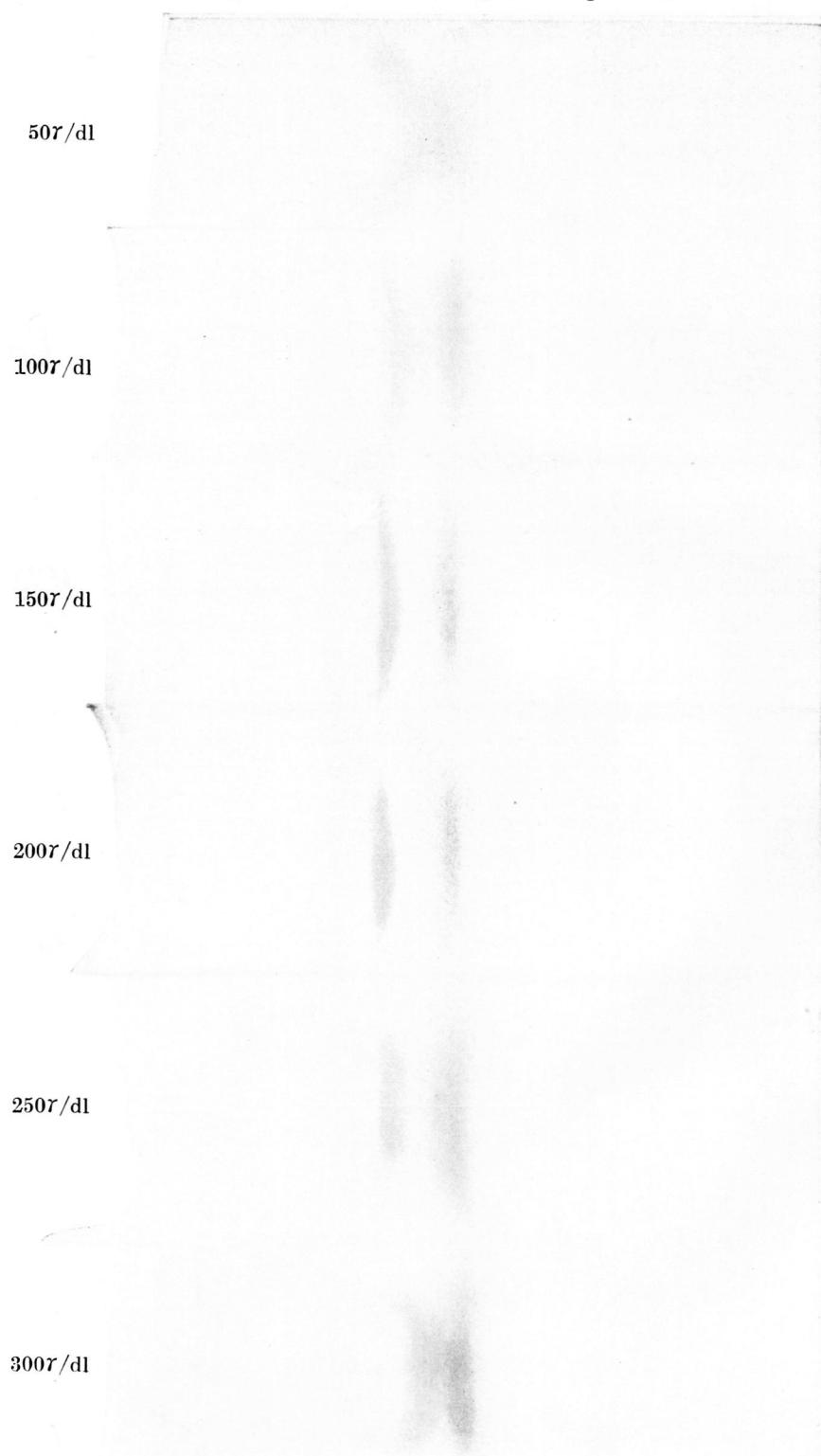


Fig. 8. Standard iron (Paper chromatography)

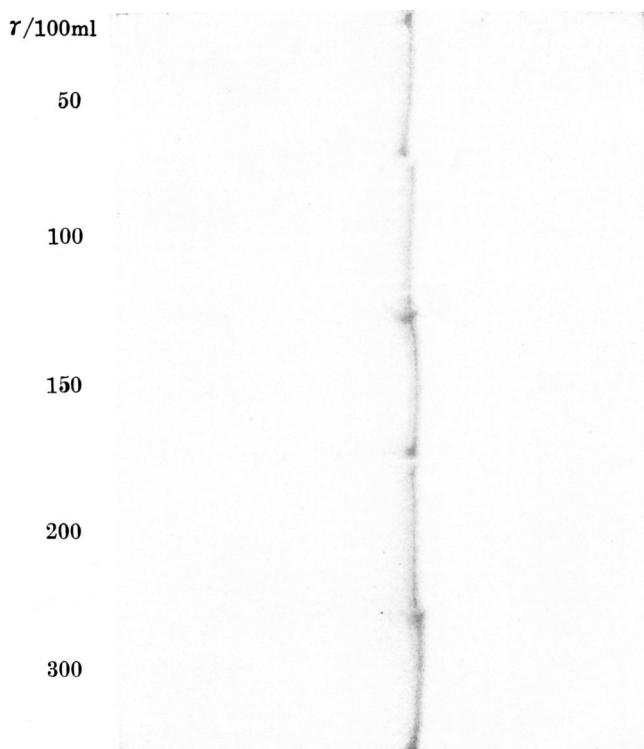


Fig. 9. Serum iron (Paper chromatography)

