

皮下組織内胆汁色素生成過程に関する 組織顕微分光学的研究

第 2 編

血色素分解中間産物負荷時の胆汁色素生成過程について

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)

西 川 祥 之 介

〔昭和34年9月8日受稿〕

血色素が分解されて bilirubin となる過程は試験管内実験に於いて既に諸家の研究によりその大綱が明らかにされている。即ち血色素は choleglobin (R. Lemberg) 乃至 verdohemoglobin (M. Engel) を経て biliverdin となり更に還元されて bilirubin となるという。一方動物の皮下組織内での血色素分解過程に就いては教室難波、西信が組織化学的に、著者は第1編に於いて組織顕微分光学的に追及し、試験管内実験と略々同一の過程を辿ることを明らかにした。

但し著者の実験では中間産物に生ずると考えられる verdohemoglobin, biliverdin, 更らには血色素の異常分解に因つて生ずると考えられる hematin よりの分解に就いては証明されていないので、改めてこれらよりの分解を顕微分光学的に追及して、第1編における実験結果を補足しようと考えた。

実験方法

健康成熟白鼠の背部皮下に verdohemoglobin 0.5 cc 宛 biliverdin 0.4 cc 宛, bilirubin 液 0.5 cc 宛 hematin 液 0.3 cc 宛を注入して経時的にこれを摘出し肉眼的、顕微鏡的及び組織顕微分光学的に観察した。

注入用 verdohemoglobin 液は牛血液より M. Engel の方法により調製した血色素 15cc に l-ascorbin 酸 500 mg を蒸溜水 2cc に溶かし1規定の苛性曹達液で pH 7.2 に補正したものを加え、摂氏38度の液温の下に1分間120気泡の割に分子酸素を90分通気して更に東洋濾紙 No. 6 で濾過した濾液を用いた。

注入用 biliverdin 液は牛血液より M. Engel の方法で作った血色素液 20cc に pH 7.2 の M/15

Sørensen 磷酸塩緩衝液 150 cc と l-ascorbin 酸結晶 1 g を N/10 苛性曹達に溶かして pH 7.2 に補正したものを加え、摂氏38度の液温の下に1分間120気泡の分子酸素を2時間通気し、これに氷醋酸 25 cc を加えて10分間放置し醋酸曹達を 15 g 加え更に ether 150 cc を注加し遠沈すると biliverdin は ether 層に移行する。これを N/50 苛性曹達液でよく混和振盪して洗い、次いでこの biliverdin を含む ether に0.5%塩酸 20cc を加えて biliverdin を抽出する。この biliverdin 塩酸塩に 12%苛性曹達液を約 1cc 滴下して pH 4.2 乃至 4.8位にすると濃緑色の絮状浮遊物を生じこれを遠心沈澱して上清を除去すると約 1cc 程の濃緑色の沈渣をえる。これに蒸溜水 2cc を加え重曹で pH 7.2 とすると緑色沈澱物は溶解して少量の濃緑色 biliverdin を得ることが出来る。

注入用 hematin 液は R. Duesberg の方法で作った hemin 100 mg を N/10 苛性曹達液 2cc に溶解して、これを pH 7.6 乃至 7.8 に補正し蒸溜水を加えて 10cc としたものをを用いた。

実験成績

1. verdohemoglobin を白鼠皮下に注入した場合

1. 1. 注入後8時間の所見

注入部表皮は汚穢暗紫色を呈し皮下組織は軽度の浮腫状を呈し一般に少々赤色を帯びている。結締織は微かに暗緑黄色を示している。顕微鏡下に検すると一部には橙褐色を示す部分もあるが、その他の部分は黄緑色を呈し所々に黄褐色の不全結晶を認める。この時期における組織顕微分光学的所見は図1の如く大略 630 m μ を中心とする吸収及び 576, 540 m μ

に於ける吸収を認める。

1. 2. 注入後24時間の所見

表皮は暗緑色を呈し、これを披見すると皮下組織は暗緑褐色を示しているが前回に於ける褐色調よりも緑色調が増強している鏡検すると皮下組織には帯状の緑色素が認められその間に大少不同の黄褐色の不全結晶物が散見される。この時期に於いて淡褐緑色を呈する部分の組織顕微分光学所見は図2に見られる様に前回の $630\text{ m}\mu$ に於ける吸収は平低下し、その他の二つの吸収も少々短波長に移行し $570\text{ m}\mu$ 及び $534\text{ m}\mu$ に於ける吸収が認められる。

1. 3. 注入後3日目の所見

注入部表皮は淡緑黄色を呈し皮下組織の緑色調は次第に消腿し、これに代つて黄色調を増してくる。鏡検すると瀰漫性に黄色を呈する部分と淡緑黄色を呈する部分とが混在乃至は交錯し、中心部ではなお極めて一部分に褐橙色を呈する部分も残存して非常に複雑な像を呈している。この時期における組織顕微分光学所見は組織所見におけると同様非常に多様性を示すが図 3, 4, 5 に示す如くである。即ち

- $578, 538$ 及び $496\text{ m}\mu$ における吸収を示すもの。
- $567\text{ m}\mu$ に於ける比較的明瞭な吸収を示すもの。
- $534, 519, 485$ 及び $458\text{ m}\mu$ における吸収を示すもの。

図1 白鼠の皮下に verdohemoglobin を注入した場合

注入後8時間

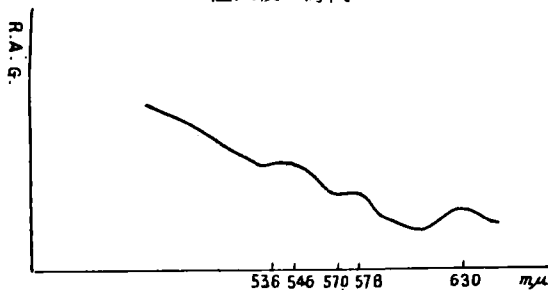


図2 白鼠の皮下 verdohemoglobin を注入した場合

注入後24時間

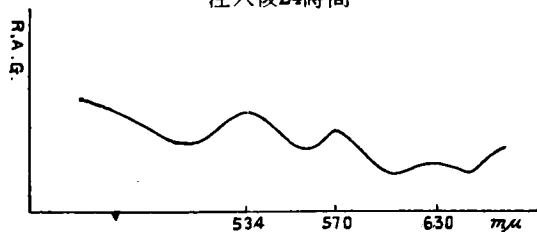


図3 白鼠の皮下に verdohemoglobin を注入した場合

注入後3日目

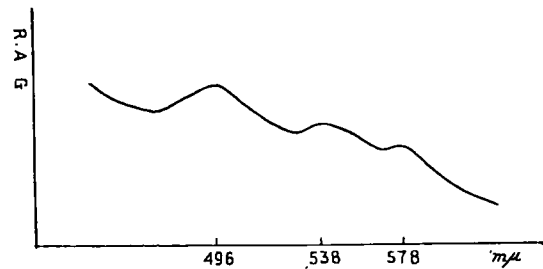


図4 白鼠の皮下に verdohemoglobin を注入した場合

注入後3日目

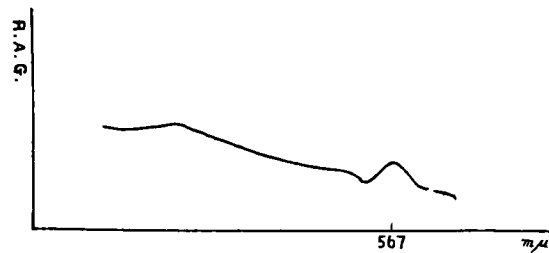
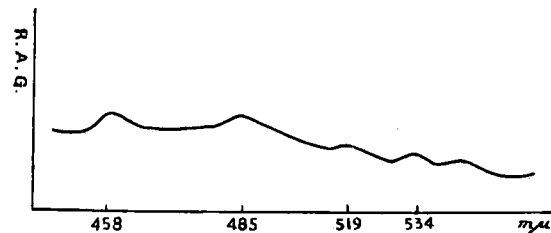


図5 白鼠の皮下に verdohemoglobin を注入した場合

注入後3日目



なお、大小形不同の黄褐色乃至暗緑褐色の結晶物について観察を行うと褐色調が強くなり光源の透過性が不十分で明瞭な吸収像を得ることが出来なかつた。

1. 4. 注入後5日目の所見

表皮は淡黄灰色を呈し皮下組織は一様に黄色乃至軽度の灰黄色を呈する。鏡検すると瀰漫性黄色物質に混じり黄色顆粒を有する組織球様細胞が見られる。瀰漫性黄色を呈する部分の組織顕微分光学所見は $478\sim 480\text{ m}\mu$ における吸収を呈する。又一部には同様な吸収所見を呈する hematoidin 結晶も散見される。

1. 5. 注入後7日目以後の所見

表皮は淡い灰黄色を呈し皮下組織では鏡検すると、組織球内外に認められた黄色色素は次第に減少し、

吸収の傾向を示し、組織顕微分光学的にも時日の経過と共に不明確となり特異な吸収像を認め難くなる。

2. hematin 液を白鼠皮下に注入した場合

2. 1. 注入後24時間目の所見

表皮は汚穢暗青色を呈し皮下組織は草緑色を呈する。顕微鏡下には草緑色の色素顆粒を有する組織球様細胞が認められ、又暗紫色乃至褐色の hematin 結晶が散見され、一部細胞内にも微細褐色顆粒として貪喰されているものがある。この時期に於いて瀰漫性黄褐色を呈する部分の組織顕微分光学的所見は図6に示す如く 562~550 m μ に於ける吸収帯を示している。

2. 2. 注入後2日目の所見

肉眼的にも又顕微鏡的にも大概前日と同様の所見を呈するが淡緑褐色を呈する部分の分光学的所見は図7に示す如く 630 m μ を中心とする吸収を示す。

図6 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後24時間

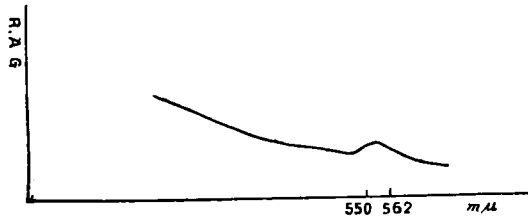
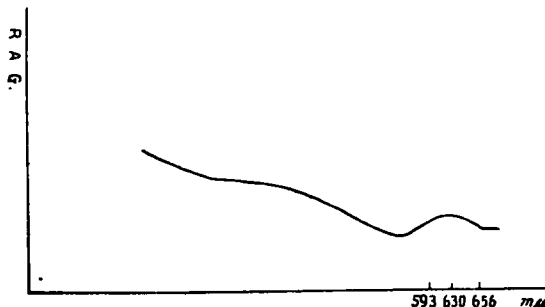


図7 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後2日目



2. 3. 注入後3日目の所見

注入部表皮は暗青色を呈し皮下に帯黄緑褐色乃至黄緑色の組織が認められる。前記の細胞内外の草緑色顆粒は次第に黄色度を増してくる。又帯黄緑褐色を呈する組織中に存する組織球様細胞の原形質中に多数の同色調の顆粒が認められる。この時期における分光学的所見は組織像のその如く多様性を呈するが図8, 9, 10, 11, 12の如くである。

a) 550~546 m μ 及び 487~478 m μ の二つの吸収を有するもの。

b) 546~536 m μ , 478 m μ 及び 464~461 m μ の三つの吸収を有するもの。

c) 562~550 m μ 及び 492~489 m μ の二つの吸収を有するもの。

d) 546~536 m μ 及び 487~478 m μ の二つの吸収を有するもの。

e) 546~536 m μ 及び 489~487 m μ の二つの吸収を有するもの。

2. 4. 注入後5日目の所見

表皮は汚穢青灰色を呈し鏡検すると組織球外の緑色調は次第に黄色調となり鉄反応陰性である。この細胞外の瀰漫性黄色乃至黄褐色を呈する組織の分光学的所見は図13に示す如く 478~480 m μ に於ける吸収を示し、既に報告した如く血色素注入時に於いて出現した瀰漫性黄色のそれと一致した。

2. 5. 注入後6日目乃至10日目の所見

表皮は汚穢灰白色を呈し皮下には黄褐色帯と無色の結締織帯が混在しており、この細胞外の黄褐色色素帯は時日の経過と共に減少の傾向を示している。この部分における分光学的所見は5日目の所見に於いて述べた如く 478~480 m μ における吸収を示す以外に図14に於けるように 526~519 m μ における吸収を認めるものがある。

2. 6. 注入後10日目以後の所見

表皮は汚穢黄色を呈し皮下組織の黄色乃至黄褐色

図8 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後3日目

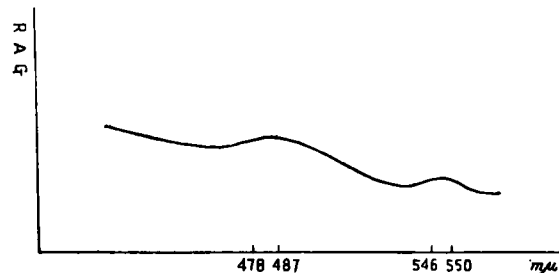


図9 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後3日目

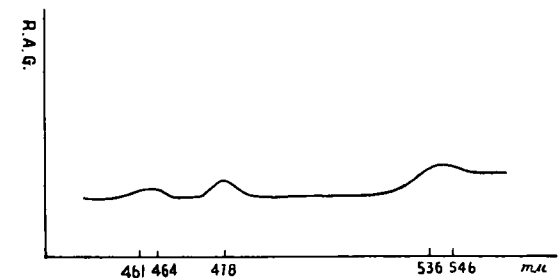


図10 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後3日目

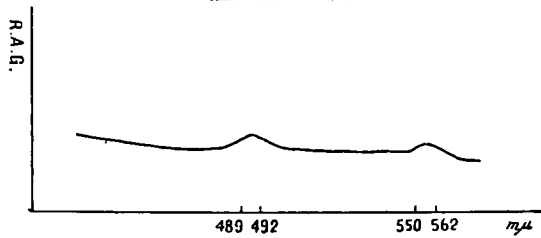


図11 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後3日目

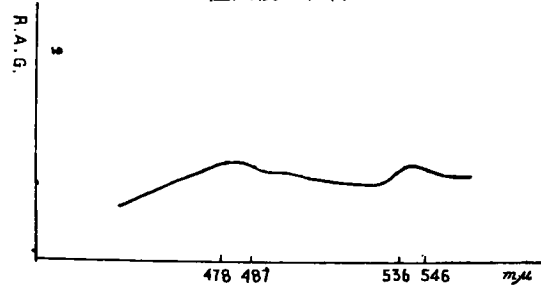


図12 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後3日目

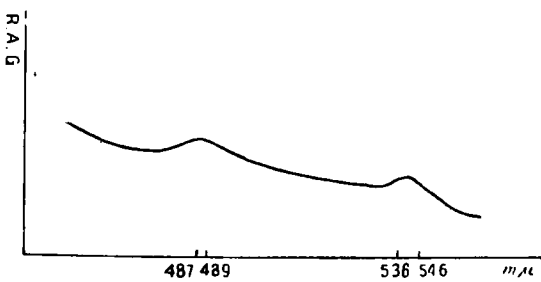


図13 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後5日目

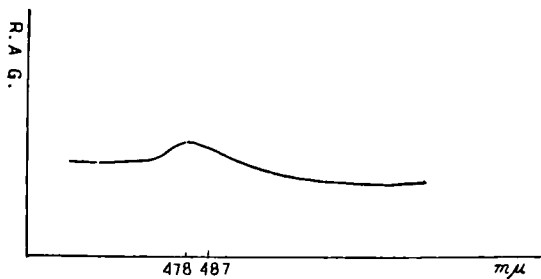


図14 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後6日目乃至10日目

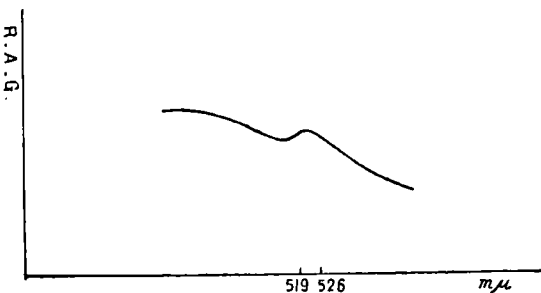
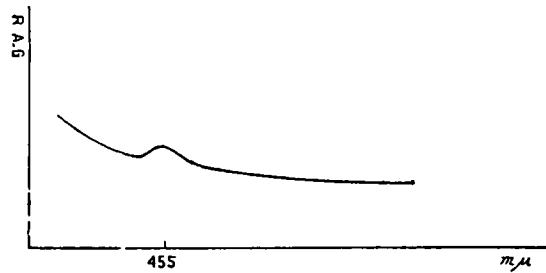


図15 白鼠の皮下に hematin を注入した場合
注入後10日目以後



は次第に消滅し、黄色顆粒を原形質中に有する組織球様細胞が散見される。この時期における分光学的所見では前述の吸収像は次第にその明瞭度を失ってくるが一部組織では図15に示す如く 455 mμ における吸収を認めた。

3. biliverdin を白鼠皮下に注入した場合

3. 1. 注入後24時間の所見

注入部表皮は暗緑色を示し周辺に向つて稍淡くなつており、一部には軽度ながら黄色調を認める。皮下組織は稍水腫状であるが緑色乃至黄緑色を呈し中心部は鮮やかな緑色で、周辺にゆくに従つて軽い黄色調を示している。鏡検すると緑色を呈する組織の細胞は緑染しており、その胞体内に微細な緑色顆粒を有しており、又周辺の黄色調を呈する部分には不明瞭ながら小型の黄褐色結晶 (hematoidin 結晶) を少数散見する。組織顕微分光学的観察では装置の能力不足 (長波長部測定不能) により注入 biliverdin に特異的な吸収像を認めることは出来なかつた。

3. 2. 注入後3日目の所見

注入部表皮は淡緑色を呈し皮下組織は黄緑色で前回の所見より緑色調を減じているが、一部には未だ緑色調の塊状組織を認める。鏡検すると注入 biliverdin は組織球様細胞内に微細明瞭な緑色顆粒として認められ、又一部には僅かながら褐色調を呈するものもある。又組織球様細胞の胞体には黄色調を帯びるものがある。この時期に於いて周辺の黄色調を呈する部分の分光学的所見は図16の如く 478~480 mμ の吸収を示す。

3. 3. 注入後5日目の所見

表皮は淡緑黄色を示し皮下組織は一部分を除いて瀰漫性黄色を示す。鏡検すると既述した組織球様細胞内の緑色微細顆粒は次第に減少の傾向を示し、又細胞の内外に相当数の菱形黄金色の hematoidin 結晶が認められ、このものは 478~480 mμ に於ける

吸収を呈する。

3. 4. 注入後8日目以後の所見

皮下組織は瀰漫性に黄色を示すが次第に吸収の傾向を示し結締織間に線状又は帯状の黄色部分として残存する。而してこれらも時日の経過と共に不明確となり特定の吸収曲線を認めがたくなってくる。

4. bilirubin を白鼠皮下に注入した場合

4. 1. 注入後8時間の所見

表皮は黄色を呈し披見すると皮下組織は鮮明且幾分光輝を有する黄色を呈しており、これを組織顕微分光学的に検すると図17の如く 478~480 m μ に於ける吸収を認める。

4. 2. 注入後3日目の所見

皮下組織は次第に稍黄色調を減じ鏡検すると黄染した組織球様細胞を認める。組織顕微分光学的所見は前回におけると同様である。

4. 3. 注入後5日目以後の所見

黄色調は時日の経過と共に次第に減少し汚穢灰黄色となり。遂には結締織内に僅かに帯状又は点状物質として残存しているのが認められるが、組織顕微分光的には特異な吸収曲線を呈しない。

図16 白鼠の皮下に biliverdin を注入した場合
注入後3日目

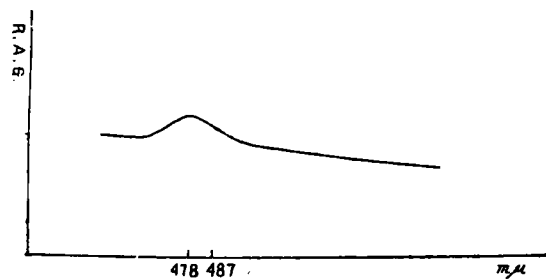
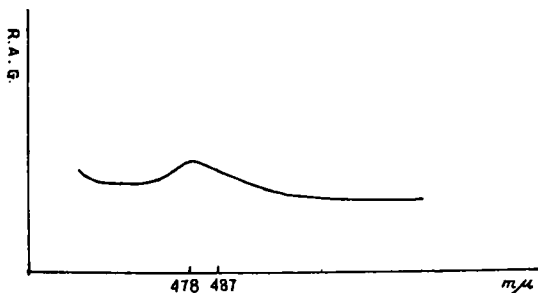


図17 白鼠の皮下に bilirubin を注入した場合
注入後8時間



考 按

血色素に l-ascorbin 酸と分子酸素を作用させて生ずる中間物質 verdohemoglobin を白鼠の皮下

に注射すると、8時間後に verdohemoglobin の 630 m μ の吸収極大の外に、576, 540 m μ の oxyhemoglobin の吸収極大を認めた。これは注射処置に際して生じた出血に基因するものと思われる。24時間では 630 m μ の吸収極大は平低下し、oxyhemoglobin の吸収極大はやや短波長に移動する。3日後には黄色を呈する部分と淡緑黄色の部分とが交錯し、吸収曲線でも複雑で oxyhemoglobin に因るものと、第1編で明らかにした bilirubin 鉄錯塩と思われる吸収極大や、bilirubin、その他の同位物質の吸収極大と思われる極大をそれぞれ認め、5日後には bilirubin の吸収極大の外に haematoidin の吸収極大を認めた。以後これらの吸収乃至減少を認めている。

処で以上の組織内観察で認めた bilirubin 鉄錯塩乃至その同位物質、bilirubin、haematoidin は注入した verdohemoglobin より分解物であるかどうかである。即ち verdohemoglobin 注入時上記の通り出血を認めているので、その出血に基く過程も考えられなければならない。第1編において血液を注入すると、4日後に bilirubin 鉄錯塩と haematoidin 結晶が証明されていることで、verdohemoglobin の 630 m μ の吸収極大が次第に減少しても直ちに bilirubin 鉄錯塩乃至 bilirubin を証明せず、一定時間後にこれらを認めたこと等からこの際 verdohemoglobin の分解を考えるよりも、出血後の分解を主として考えるのが妥当と思われる。

次に hematin を白鼠皮下に注射すると、注入2日後に 630 m μ を中心とする吸収を示し、3日後には 562~550 m μ は短波長にやや移動すると共に 487~478 m μ 、478 及び 464~461 m μ 、489~487 m μ 等に新しい吸収極大をみとめた。bilirubin の皮下組織中での吸収極大は第1編の成績では 478~480 m μ で、bilirubin 鉄錯塩のそれは 495 m μ の極大であると考えたが、それによれば既にこの時期において bilirubin 或いは bilirubin 鉄錯塩が生成されていると考えて誤りはない。そのことは5日後において bilirubin の生成を証明することでも明らかである。

教室の西信は hematin を家兎の皮下に注射して bilirubin の生成を証明しているが、この際 hematin が試験管内実験において血清 albumin と結合し methalbumin を生成し、次いで verdohemochrome へと分解されるとなす教室中西の実験を参照し、おそらく hematin が組織蛋白と結合して分解を受けるものと考えた。ところで methalbumin の吸収

極大は 623, 640, 500 $m\mu$ であるが, 本実験の過程にはこれらの吸収極大は全く認めていない. 一方試験管内実験において pyridin-hematin に l-ascorbin 酸と分子酸素を作用させると尼子によれば, 565, 530 $m\mu$ の pyridin-hemichromogen の吸収極大に次いで 630 $m\mu$ を中心とする吸収極大を示し, 更に 656 $m\mu$ の吸収極大を示すことが知られている. 従つて皮下における hematin の bilirubin への分解過程は methemalbumin を生成することなく上記の試験管内実験過程と同様の過程を示すものと考えられよう.

biliverdin を白鼠の皮下に注入した際は24時間後既に注入部の周辺に hematoidin 結晶を認め, 3日後には吸収曲線でも明らかに bilirubin を証明し, biliverdin より bilirubin への還元を証明しえた.

以上により verdohemoglobin 注入時には直接それ以後の分解が行われたか否か確認は出来なかつたが, biliverbin 注入時には明瞭に bilirubin への還元を認め, 更に hematin 注入時には, 試験管における pyridin-hematin-l-ascorbin酸-O₂ 反応系と略々同一過程を辿り bilirubin の形成が行われることを明らかにした.

結 論

1) 白鼠の皮下に verdohemoglobin を注入すると, 注射処置に際し生じた oxyhemoglobin よりの分解が混入する為, 組織球内外に於いて 478~480 $m\mu$ に吸収を有する bilirubin の生成が verdohemoglobin より生成されたものかどうか判定し難かつた.

2) 白鼠の皮下に biliverdin を注入すると比較的早期に bilirubin の出現を認め, その中に比較的多数の hematoidin 結晶の出現を認めた.

3) 白鼠の皮下に hematin を注入すると methemalbumin を生成することなく, 630 $m\mu$ 物質をへて bilirubin へと分解される.

主 要 文 献

- 1) 難波: 日本内科学会雑誌, 第41巻, 第7号, 401 (昭27).
- 2) 難波: 医学研究: 第24巻, 第1号, 16 (昭29).
- 3) 尼子: 医学研究, 第27巻, 第7号, 182 (昭32).
- 4) H. Fischer u. F. Reindel: Z. physiol. Chem., 127, 299 (1923).
- 5) M. Engel: Z. physiol. Chem., 266, 135 (1940).
- 6) R. Lemberg, J. W. Legge & W. H. Lockwood: Biochem. J., 35, 328, 339, 353, 363 (1941).
- 7) R. Duesberg: Arch. exper. path. u. Pharm. 174, 305 (1934).
- 8) N. H. Fairley: Nature, 142, 1156 (1938).
- 9) O. Warburg u. E. Negelein: Ber. dtsh. Chem. Ges. Berlin. 63, 1816 (1930).
- 10) R. Lemberg: Biochem. J. 29, 1322 (1935).
- 11) 小坂 東京医事新誌, 第56巻, 第2号, 9 (昭24).
- 12) 江国: 医学研究, 第22巻, 第1号, 122 (昭27).
- 13) 永井: 医学研究, 第22巻, 第8号, 124 (昭27).
- 14) 山本: 医学研究, 第21巻, 第12号, 10 (昭26).
- 15) 三宅: 医学研究, 第21巻, 第11号, 24 (昭26).
- 16) 西信: 医学研究, 第25巻, 第7号, 51 (昭30).
- 17) 阿曾沼: 医学研究, 第21巻, 第6号, 95 (昭26).
- 18) 中西: 医学研究, 第26巻, 第4号, 48 (昭31).
- 19) 龍治: 医学研究, 第23巻, 第12号, 101 (昭28).

Histomicroscopic Photometric Studies on the Formation Process of Bilirubin in the Subcutaneous Tissue

Part I Studies on the Formation Process of Bilirubin by the Administration of Intermediate Products of Hemoglobin Decomposition

By

Shonosuke Nishikawa

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

Conclusions

The formation of bilirubin with the absorption maximum at 478—480 $m\mu$ from verdohemoglobin could be scarcely decided, because the mixture of decomposition from the oxyhemoglobin produced by the subcutaneous injection of verdohemoglobin to white rat.

2. The appearance of bilirubin was observed at the relatively early period on the administration of biliverdin to white rat and the appearance of relatively numerous hematoidin crystal was observed.

3. On the subcutaneous administration of hematoidin to white rat, it elapsed the product displaying the absorption maximum at 630 $m\mu$ and resolved to bilirubin without the formation of methemalbumin.
