

骨髄機能と鉄代謝に関する研究

第二編

骨髄細胞の鉄代謝について

(本論文の要旨は第19回日本血液学会総会において発表した)

岡山大学医学部平木内科(主任:平木 潔教授)

副手 塩見文俊

〔昭和33年5月8日受稿〕

内 容 目 次

第1章 緒 言

第2章 実験材料並に実験方法

第3章 実験成績

第1節 骨髄細胞の鉄摂取とヘム合成との関係

第2節 米山・紺野氏非ヘミン鉄分劃法の適用

第3節 ヘミン鉄, 非ヘミン鉄分離の術式の

比較

第4節 成熟赤血球の鉄摂取とヘム合成

第5節 好気性及び嫌気性培養の比較

第6節 骨髄細胞外鉄量の影響

第7節 正常人及び各種血液疾患々者血清添加の影響

第4章 総括並に考按

第5章 結 論

第1章 緒 言

既に前編において述べたように, 生体内の鉄の重要な役割はヘミン鉄として酸化還元反応その他の重要な生命機序に関与する事であつて, ヘミン鉄の大部分を含む色素についてはその構造, 機能, 生成, 破壊いづれも古くより研究者の興味を呼び, 多数の研究がなされている. この中比較的最近急速な発展を遂げつつあるのが色素の合成面であつて, 実験方法も次第に改良され, *in vivo* の実験から進んで *in vitro* で合成を行わせる事が出来るようになり, 更に放射性同位元素の導入によつて合成の機構を化学的に追跡する事が出来るようになった⁵⁹⁾.

色素はヘムとグロビンよりなり, ヘムはプロトポルフィリン核に鉄の入つたものである事は周知の事実であるが, Shemin 等⁶⁰⁾ 及び Muir 等⁶¹⁾ は *in vivo* 及び *in vitro* で C^{14} , N^{15} を含んだグリシン, 酢酸のヘムへの incorporation を検索し, プロトポルフィリンを構成する8個の炭素及び窒素はグリシンの α -炭素と窒素に由来し, 他の26個の炭素は酢酸のメチル炭素及び炭酸基炭素に由来する事を証明し, 更にこの合成に影響する諸因子について検

討を加えている.

次にこのポルフィリン核に鉄の入る機構, 換言すれば非ヘミン鉄がヘミン鉄に転化する機構については Jensen⁶²⁾, 紺野⁶³⁾, Lajtha⁶⁴⁾, 中尾⁵⁹⁾ 等の業績があり, 漸次明かになつて来ている.

London⁶⁵⁾ は色素の合成と素材の細胞膜通過とは別の機構であろうと推論したが, Jensen⁶²⁾ は鴨赤血球を Fe^{59} と共に培養すると赤血球内 non-hemoglobin red cell iron⁶⁶⁾⁶⁷⁾⁶⁸⁾ にも Fe^{59} が入り, これは全く non enzymatic な拡散によると述べ, 中尾⁵⁹⁾ は鳩赤血球を Fe^{59} と共に培養して同様の結論に達し, いづれも London の説に実験的根拠を与えている. 又 Lajtha⁶⁴⁾ は人の骨髄穿刺液を Fe^{59} と共に培養して Autoradiograph を作り, 鉄は比較的幼弱な赤芽球にとられて細胞内に蓄積された後にヘム合成に利用されると報告し, 教室の木村⁴⁷⁾ は Kaplan⁶⁹⁾ のいう Sideroblast を種々の血液疾患々者及び実験貧血家兔について検索してこの赤芽球内可溶性鉄をヘム合成の素材と見做した.

前編において私は投与された鉄が貯蔵鉄として組織にとり入れられ, 更に色素の素材として骨髄のヘム合成の場に移動する状態を観察し, この際米

山・紺野氏法²⁰⁾の PIII が非ヘミン鉄の中もつともヘム合成の場に近く、従つて利用され易い鉄である事を推論した。この際、経時的に分割鉄の消長を追う事により、非ヘミン鉄よりヘミン鉄への過程がある程度辿る事は出来たが、これはあくまでも非ヘミン鉄の範囲に止つており、ヘム合成に伴う二次的現象の性質を解明したに過ぎない。従つて今回は積極的にヘム合成の場の性質を追究する試みとして、Jensen⁶²⁾、小池⁷⁰⁾、紺野⁶³⁾、中尾⁵⁹⁾、岩崎⁷¹⁾等の方法を参考とし、*in vitro*における骨髓細胞の鉄の摂取及び摂取された鉄のヘムへの incorporation に影響すると思われる数種の factor について検討を加えた。即ち家兔の骨髓細胞浮遊液に放射性鉄 (Fe^{55}) を添加して一定時間 $37^{\circ}C$ に保ち、細胞の摂取する鉄及びヘムに incorporate する鉄の量を種々の条件下に比較した。

第2章 実験材料並に実験方法

1) 実験材料

1.2~1.5 kg の比較的幼弱な家兔を使用した。必要に応じて瀉血によつて造血機能を亢進させて実験に供した。

2) 骨髓細胞浮遊液の作製

上記家兔の頸動脈を切断して可及的大量失血させた後、速かに上、下腿骨、上腕骨を摘出し、(以後無菌的に) 骨髓をとり出して生理的食塩水内で軽く圧迫を加えてほぐし、ガーゼで濾過する。濾液を遠沈して上清を去り、沈渣(骨髓細胞)を数回生理的食塩水で遠沈洗滌し、同液で薄めて一定量とした後、これにヘパリン、ペニシリン及びストレプトマイシン少量づつ添加する。

3) 放射性鉄添加

骨髓細胞浮遊液に実験に応じて適当量の放射性鉄を塩化第二鉄の形で添加して一定量づつ容器に分注する。その一つを対象として他に条件を附加し、一定時間 $37^{\circ}C$ に incubate した後、細胞を $0^{\circ}C$ の生理的食塩水で洗滌する。

4) ヘミン鉄、非ヘミン鉄分離

主として Brückmann-Zondeck の法²³⁾ に拠つた。分離の術式の検討は次章にゆづる。

5) 放射能測定法

資料の灰化に際して、Brückmann-Zondeck の法²³⁾ の非ヘミン鉄分割は前編に詳述した Copp-Greenberg²²⁾ 及び Vosburgh¹⁸⁾ の法を変更した方法で行い、他は Peacock¹⁹⁾ の法によつた。鍍金、

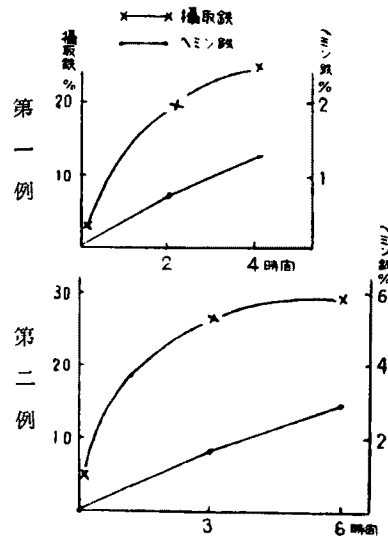
計数值測定も前編に述べた方法によつた。

第3章 実験成績

第1節 骨髓細胞の鉄摂取とヘム合成との関係 (第1図)

瀉血により高度に造血機能を亢進せしめた家兔の骨髓細胞を、放射性鉄約 100% を含む生理的食

第1図 家兔骨髓細胞の鉄摂取とヘム合成との関係
幼弱家兔 pro kg 5 cc 連続5日瀉血



塩水中で培養した。第1例においては2時間後骨髓細胞は加えた鉄量の約20%を摂取し、4時間後約30%に及んだ。第2例において摂取鉄は3時間後27%、6時間後29%であつた。この増加はほぼ logarithmic な曲線を描き、6時間ではほぼ平坦になるものと推測される。

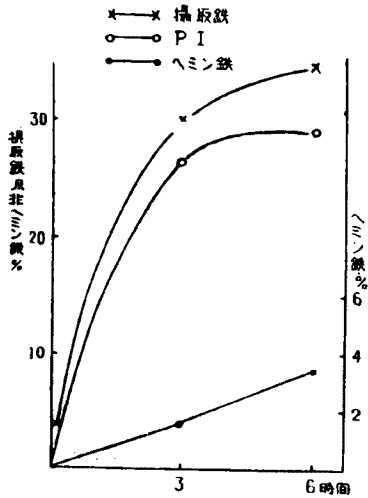
摂取された鉄よりヘミン鉄を分離した所、第1例では2時間後、加えた鉄量の0.7%、4時間後1.3%、第2例では3時間後1.8%、6時間後3.5%でいづれもほぼ直線的な増加を示した。

第2節 米山・紺野氏非ヘミン鉄分割法の適用 (第2図)

放射性鉄約 100% を含む生理的食塩水で培養した骨髓細胞に米山・紺野氏法²⁰⁾ を適用して、摂取された鉄の中の非ヘミン鉄がこの法に如何なる反応を示すかを見た。

摂取された鉄の84~87%は P I に属し、非ヘミン鉄の残りは S III であつた。しかして P I の増加

第2図 米山・紺野法の適用
幼弱家兔 pro kg 5 cc 連続5日瀉血
Fe 100γ% (FeCl₃)



は細胞の鉄摂取とほぼ平行して増加しており、ヘミン鉄の増加と平行関係は見られなかつた。

第3節 ヘミン鉄、非ヘミン鉄分離の術式の比較 (第1表)

Brückmann-Zondeck の hot pyrophosphate method²³⁾ (第1表I) と Yabusoe⁷²⁾ の記載した法、即ち資料を定規塩酸と冷純メタノールで処置し、遠沈して沈渣をメタノールで数回沈澱し上清を集め、硫酸マグネシウムと共に振盪した後遠沈して得た上清をヘミン鉄とする方法 (第1表II) 及び中尾⁵⁹⁾ の記載した法、即ち蒸留水で溶血後、Parpart⁷³⁾ に従つて炭酸ガス飽和蒸留水 (10°C 以下, pH 4.7) 10%食塩水を用いて非液相部を洗滌し、この沈渣に Brückmann-Zondeck の hot pyrophosphate method²³⁾ を用いて非ヘミン鉄を抽出する方法 (第1表III) を比較した。骨髓細胞の摂取した鉄からヘミン鉄、非ヘミ

第1表 ヘミン鉄分離の術式の比較
正常家兔骨髓 Fe 40γ% (FeCl₃)

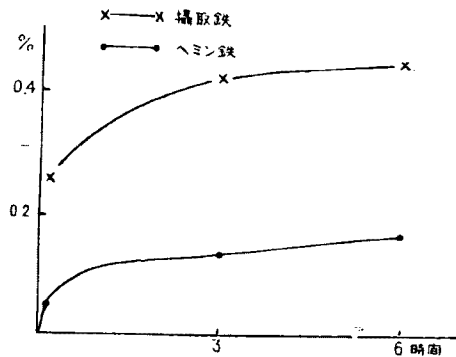
		%(2時間)	%(4時間)
I	ヘミン鉄	18.4	20.9
	非ヘミン鉄	81.6	79.1
II	ヘミン鉄	22.8	25.8
	非ヘミン鉄	77.2	74.2
III	ヘミン鉄	24.9	29.8
	非ヘミン鉄	75.1	70.2

ン鉄の百分率を求めると、Brückmann-Zondeck²³⁾ の法でヘミン鉄の収量が少い。しかし時間的にヘミン鉄の増加する比率は三者共大差を認めない。なお Brückmann-Zondeck の cold pyrophosphate method は hot pyrophosphate method と殆んど完全に一致した。

第4節 成熟赤血球の鉄摂取とヘム合成 (第3図)

家兔血液を生理的食塩水で7.5倍に稀釈し、放射性鉄を90γ%となるように添加して培養した後、

第3図 正常家兔血液の鉄摂取及びヘム合成 Fe 90γ%



上記 Yabusoe⁷²⁾ の法に拠つてヘミン鉄を分離した。

鉄摂取は非常に低調で、その曲線は Plateau に達するのが速いようである。しかし摂取された鉄のヘミン鉄になる割合は骨髓より比較的大きい。

第5節 好気性及び嫌気性培養の比較 (第4図)

嫌気性実験には窒素ガスをフラスコの容量の約20倍通じつつ内容を振盪した後、気相を窒素ガスで満たす。好気性は気相を空気とした。

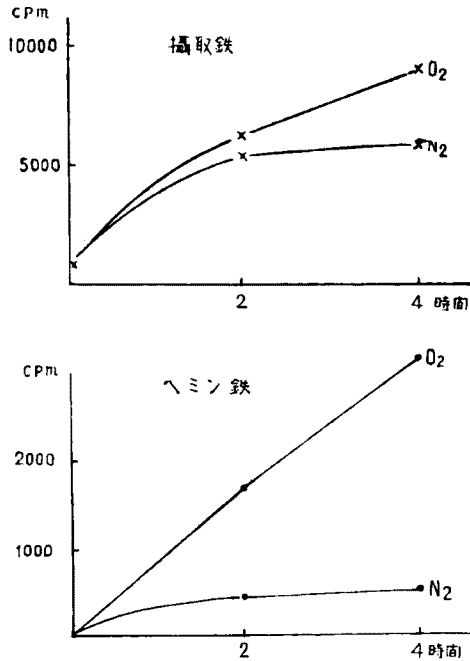
鉄摂取は好気性においてやや勝り、ヘミン鉄に入る度合は好気性が嫌気性の4~5倍の高値を示した。

第6節 骨髓細胞外鉄量の影響 (第5図)

骨髓細胞浮遊液中の鉄濃度を種々変化せしめて、骨髓細胞の鉄摂取、ヘム合成に及ぼす影響を観察した。

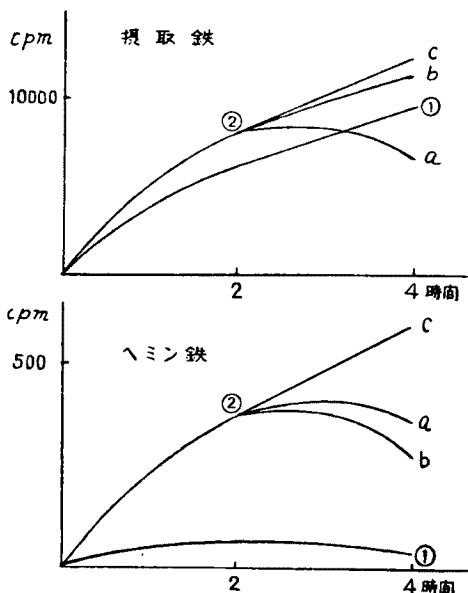
鉄濃度 230γ%と30γ% (放射性鉄量は同じ) で比較すると、計数値では後者が摂取鉄、ヘミン鉄共に大である。しかし鉄量に換算すると摂取鉄は230γ%の方が5.5~6倍多い。ヘミン鉄は2時間後では230γ%の方がやや多い(約1.3倍)が、4時間後には減少し、30γ%の方はひき続き増加するため、

第4図 好気性と嫌気性培養の比較



第5図 培養液中の鉄濃度の変化

- ① Fe 230%
- ② Fe 30% (count 数は同じ)
- a. 2時間後細胞を3回洗滌, 鉄を含ませ培養液中で再培養
- b. 2時間後 200%非活性鉄を加える
- c. 30%のまま培養



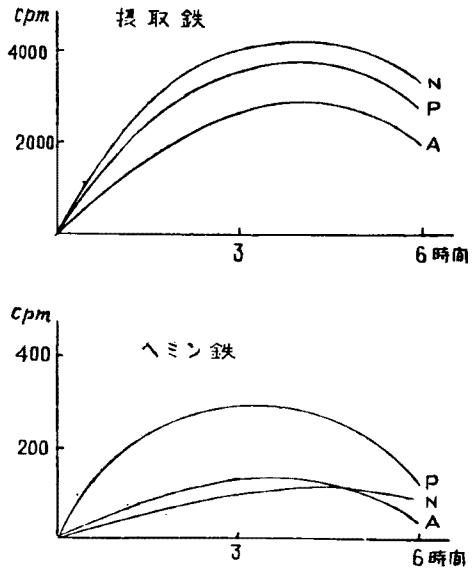
30%の約1/2となつている。次に30%で2時間培養した後、細胞を生理的食塩水で3回遠沈洗滌し、鉄を含ませ生理的食塩水中で再び培養を続けると、摂取された鉄は減少するが、ヘミン鉄には殆んど減少が見られない(第5図a)。30%で2時間培養した後、200%に相当する非活性鉄を加え、引き続き培養すると摂取鉄量は著明に増加する(第5図b)。図でbはcよりやや低くなつているが、2時間より4時間にかけてbはcの1/10程度の比放射能の鉄を摂取しているから、実際の摂取鉄量はcを遙かに越えている事になる。一方ヘミン鉄は摂取された鉄に比例して増加せず、むしろ減少する傾向を示している点特異的である。

第7節 正常人及び各種血液疾患患者血清添加の影響(第6, 7図)

3時間より6時間にかけて摂取鉄、ヘミン鉄共に増加は殆んど見られず、むしろ減少する傾向が見られる。図示するとその曲線はその形状が夫々異つており、互に比較する事は難しいが、きわ立つた点としては鉤虫症血清で鉄摂取の少い事、真性多血症血清でヘミン鉄の多い事があげられる。なお再生不良性貧血患者血清ではヘミン鉄はやや低値を示した。

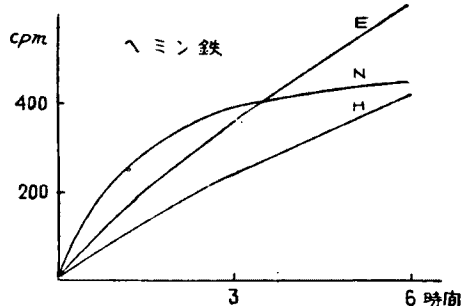
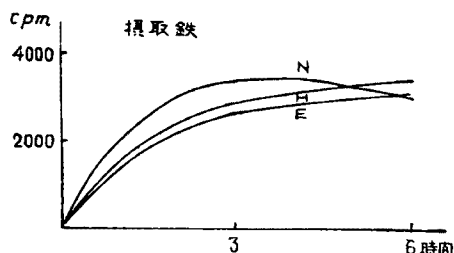
第6図 各種血液疾患患者血清添加(I)

- A 鉤虫症患者血清
- P 真正多血症患者血清
- N 正常人血清



第7図 各種血液疾患患者血清添加(II)

- E 本態性萎黄貧血患者血清
- H 再生不良性貧血患者血清
- N 正常人血清



第4章 総括並に考按

赤芽球の鉄代謝をとり扱う場合には多数の問題点がある。即ち鉄の細胞膜通過、細胞内非ヘミン鉄の消長、鉄の荷電の状態、プロトポルフィリン核へのincorporation、色素の破壊などであるが、この際色素の破壊には触れない。

血漿内では鉄はβ₁グロブリンと結合している。この状態と塩化第二鉄では骨髓細胞の態度が幾分異なる事が想像されるが、この一連の実験では可及的に鉄と骨髓細胞の関係を単純化するため血清は加えなかつた。もし血清を添加すれば、その血清鉄量、鉄結合能など多数の要素を考慮せねばならぬからである。

実験成績の第1, 2節で述べたように、細胞の鉄摂取のカーブとヘミン鉄のカーブとはその形状が著しく異つている。前者は所謂logarithmicなカーブで、後者は殆んど直線的である。ある液の溶質が他の溶媒に拡散する状態を模式的に考えれば、濃度の経時的増加はlogarithmicなカーブを描くはずであるから、上記の摂取鉄のカーブは「鉄の細胞膜通過は拡散に似た現象であろう」という中尾⁵⁹⁾の説を裏書きするものようである。一方ヘミン鉄の増

加は非ヘミン鉄(素材?)の増加と平行関係なく、一定の増加率を保っている。これは鉄摂取とヘム合成を別々の機構とするLondon⁶⁵⁾、中尾⁶⁶⁾等の説と一致し、ヘム合成に関与する一定の酵素系の存在を想像させるものである。

次に骨髓細胞に米山・紺野氏法²⁰⁾を適用する事には疑義なしとしないが、前述の骨髓細胞の非ヘミン鉄が単に細胞表面に無機鉄のままに附着しているに過ぎないものならば当然SIIIに含まれるであろう。又すでに蛋白と結合しているものならば(この場合血漿蛋白は全く存在しない)この手技に対してどのような反応を示すか、も興味ある問題である。私の実験成績から考えると、非ヘミン鉄の中80%以上はある種の蛋白(?)と結合しているようで、この増加は細胞の鉄摂取とほぼ平行している。この量が比較的多い事は前述の鉄摂取、ヘム合成両機構の相異と相俟つて、いわば骨髓細胞内非ヘミン鉄の予備結合能の大きい事を示すものであろう。

ヘミン鉄の最も純粋な取り出し方はFischerのヘミン結晶法⁷⁴⁾及びその変法である。しかしこの方法は回収率が悪く、骨髓細胞のように色素含量の少ない場合誤差を生じ易い。他の方法でヘミン鉄、非ヘミン鉄を分離してその量を比較した所、各法、量的な差はあるが、経時的増減はほぼ平行した。なおBrückmann-Zondeck²³⁾は血液のようなヘミン鉄の著しく多いものではhot pyrophosphate methodで煮沸する時間を増すにつれて非ヘミン鉄の抽出量が増すが、cold pyrophosphate methodでは24時間で一定の値を得ると記載しているが、この点骨髓細胞では両者殆んど同値を示すので、この一連の実験では主としてhot pyrophosphate methodを用いた。

網赤血球にヘム合成能のある事については既に多数の報告がある⁷⁵⁾⁷⁶⁾⁷⁷⁾。又一度ヘムに合成された鉄は交替しないといわれている⁷⁸⁾⁷⁹⁾。私の実験で血液に放射性鉄を加えた場合に血球に鉄が摂取されたのは恐らく網赤血球によるものであろう。しかしその鉄の摂取は極めて低調であつて、摂取された鉄のヘムに入る率は比較的大きい。即ち網赤血球は骨髓細胞に比較して上述の細胞内非ヘミン鉄の予備結合能が低いものと想像される。

次に好気性培養で嫌気性培養よりもヘム合成が著しく増大していた。さきの中尾⁶⁹⁾、吉場⁸⁰⁾等は鳩赤血球及び犬網赤血球を放射性鉄と共に培養し、嫌気性培養は好気性の場合と比較して殆んど見るべき影響を示さなかつたと報告している。又古く

Rosin⁸¹⁾ は, *in vitro* で12%以下の酸素濃度では骨髄細胞の変性を来し, しかも赤血球系が酸素欠乏に敏感であると述べ, Thomas⁸²⁾ は *in vitro* でグリシン-2-C¹⁴ のヘムへの incorporation は完全な無酸素状態では停止すると述べている. 一方紺野⁶³⁾ は, プロトポルフィリンに鉄が入る場合嫌気性の方が入り易く, システイン或いはアスコルビン酸を加えると更に incorporation がよくなると報告している. 事実, ヘム合成のためには $Fe^{+++} \rightarrow Fe^{++}$ の過程が必要であるから, この点嫌気性培養或いは還元剤の存在は有効と思われる. 紺野⁶³⁾ の実験では培養時間を短くして色素の合成の面のみを端的に表現するよう試みているが, 私の場合培養時間が長く, ヘミン鉄の曲線はヘムの合成と分解の動的平衡を示す事になる. かかる長時間の嫌気性培養は鉄のプロトポルフィリン核への incorporation 以外の面で細胞の物質代謝に阻害的に働き, 二次的にヘム合成を抑制するものと想像される.

次に培養液中の鉄の濃度を変えた場合, 濃度が大きであると鉄の摂取は著明に亢進する. しかしヘミン鉄はこれに伴って増加せず, 細胞内非ヘミン鉄が多量に蓄積するとむしろ減少して来る. これは前述の鉄摂取とヘム合成が別個の機構であろうという推論を裏づけるものであると同時に, 細胞内の多量の非ヘミン鉄はむしろヘム合成に阻害的に働く事を示唆するものであろう. 又, 鉄を摂取した細胞を洗滌して生理的食塩水に再浮遊させると非ヘミン鉄が減少する事から, 摂取された鉄がある程度外に出る可能性もあるものと考えられる.

Thomas⁸³⁾ は *in vitro* で家兎骨髄細胞のヘム合成能をグリシン-2-C¹⁴ の incorporation から検索し, 人血清を添加した際に抑制が起る事を報告した. 又教室の岩崎⁷¹⁾ は創案した家兎骨髄体外液体培養法を用いて各種血液疾患患者血清添加の影響を観察したが, 培養液 2 cc に血清 0.04 cc を添加した場合には殆んど溶血は見られず血球の増生が起り, 再生不良性貧血患者血清添加では赤血球増生, 色素量が増大共に著しく抑制され, 鉤虫症貧血, 本態性萎黄貧血患者血清にもわづかに抑制作用がある事を認めている. 私の実験で血清を添加した場合, 鉄の摂取量に影響する factor として加えた血清の鉄量,

血清の不飽和鉄結合能が問題となるが, これらを統一する事は不可能であつて, 実験結果より逆に血清を得た人の造血機能を類推する事は困難であつた.

以上, 実験成績の各項について考察を加えたが, これを総括すると, 骨髄細胞が鉄を摂取する機構は, 末梢血球について中尾⁵⁹⁾ の述べたように拡散に近い現象という事が出来, 外界の鉄濃度に応じて比較的少量の鉄を摂取することが出来る. この鉄は大部分或る種の蛋白(?)と結合した非ヘミン鉄として存在するものと思われる. しかし骨髄細胞内には正常時に存在する非ヘミン鉄より相当多量の非ヘミン鉄を貯える余力があるらしく(細胞内非ヘミン鉄結合能), この能力は末梢赤血球では小さい. しかし多量の鉄が細胞内に入った場合, 細胞の機能, この一連の実験ではヘム生成能をある程度障害するものと思われる. 嫌気性培養は長時間続けると何らかの機序でヘム合成に抑制的に作用するようと思われるが, これに対しては異論もあり, 更に今後の研究にまちたい.

第5章 結 論

家兎骨髄細胞浮遊液に放射性鉄を添加し, 骨髄細胞の鉄摂取及びヘム合成能に影響する条件を検討して骨髄細胞内の鉄代謝に考察を加えた.

骨髄細胞は外界の鉄を比較的自由に摂取してその大部分をある種の蛋白(?)と結合した形で貯える. この際, ヘム合成の素材として必要な以上に著しく多量を貯える余力があると思われる. この能力は末梢赤血球では著しく少い. ヘミン鉄中への放射性鉄の incorporation は摂取鉄量と比較的無関係に一定の速度で進行する. 多量の細胞内非ヘミン鉄はかえつてヘム合成に阻害的に働き, 又嫌気性条件でもヘム合成は阻害される.

稿を終るに当り終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜つた恩師平木教授に深甚の謝意を表すると共に大藤助教授の御校閲並に木村博士の御援助を深謝する.

(文献は巻尾に一括記載する)

Studies on the Bone Marrow Function and the Iron Metabolism

Part 2. On the Iron Metabolism of Bone Marrow Cells

By

Fumitoshi Shiomi

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

The uptake and utilization of radioactive iron by rabbit bone marrow cells under various conditions *in vitro* was studied, and the iron metabolism in bone marrow cells was discussed.

The bone marrow cells were capable of taking up radioactive iron from media (physiological saline solution containing $\text{Fe}^{55}\text{Cl}_3$), and with an increase in the concentration of iron media the uptake increased to some extent. The greater part of the intracellular iron was reserved in the form binding with some proteins (?) and its capacity was greater than a sufficient amount of materials for heme synthesis. However, the capacity decreased in matured red cells.

The incorporation of radioactive iron into heme increased constantly with the lapse of time and irrespective of the amount of the iron uptake. The large amount of intracellular non-hemin iron as well as the anerobic state caused inhibition for the heme synthesis.
