

Heinz小体の性格に関する研究

第 1 編

Heinz小体の生化学的性質について

岡山大学医学部放射線医学教室（主任：山本道夫教授）

大学院学生 平 木 祥 夫

〔昭和43年3月18日受稿〕

目 次

I. 緒 言	6. ガスクロマトグラフィー
II. 実験材料並びに実験方法	III. 実験成績
1. 実験材料	1. 薄層クロマトグラフィーによる分析成績
2. Heinz小体形成法	2. ガスクロマトグラフィーによる分析成績
3. Heinz小体並びに赤血球礎質の分離	IV. 考 察
4. 脂質抽出法	V. 結 語
5. 薄層クロマトグラフィー	

I. 緒 言

一般に正常成熟赤血球は新鮮標本あるいは固定標本で無構造に見えるのが普通であるが、一定の病的状態においては内部にある種の顆粒状小体の出現を認めることがある。1890年 Heinz¹⁾は毒物による赤血球の形態的变化と題する論文の中でphenylhydrazine及びその誘導体により赤血球にもたらされる形態的变化を観察し、そこに出現する顆粒に対して Heinz小体と命名し、初めて詳細な記載を発表した。即ちHeinzの記載による Heinz小体とは、犬及び家兎に phenylhydrazine を注入して24時間後にその赤血球にあらわれ、強く光を屈折し、新鮮標本においても容易に見ることができる円形、卵円形、又は鋸歯状を呈する小体で、その大きさは1~2 μ の直径があり、1~数個認められる。通常この小体は赤血球の周縁部に位置していることが多いが、時として赤血球外、即ち血漿中に遊離して存在することもある。Heinzはこの小体が0.6%食塩水 methyl violet 飽和溶液による超生体染色によつて特に鮮明に紫青色に染まることを発見した。Heinz小体のような形態的变化を示す顆粒の存在は、既に1882年 Riess²⁾が塩素酸カリウム中毒患者の赤血球中に認め、やや遅れて Marchand³⁾はナトリウム塩中毒の犬で、また1889年

Lewin⁴⁾も試験管内で hydroxylamine 処置による赤血球内にやはり顆粒の形成を観察している。

Heinzの報告以後 Heinz小体に関する研究は血液学者の注目するところとなり、現在に至るまで多数の研究業績が相次いで報告されている。特に産業の発達と共に化学薬品の中毒による血液障害が増大し、sulfapyridine, nitroaniline, nitroglyceline, nitrobenzene等の中毒に際して Heinz小体が出現することから産業衛生的立場からも盛んに研究され、ある種の薬品の毒性判定に利用された⁵⁾。また生理的な赤血球処理機構の研究上 Heinz小体含有赤血球が利用されたり⁶⁾、Heinz小体の出現は血色素分解を伴う赤血球内破壊を指標するものとして、赤血球の寿命にむすびつけて考えられたこともある⁷⁾。吉田、河村、直等⁸⁾⁻¹³⁾は Heinz小体を系統的に観察し、試験管内形成促進法を用いて疾患の重篤度測定反応として臨床検査に利用し、草加¹⁴⁾は同様微量促進法によつて放射線血液障害の診断を試みている。

初期のHeinz¹⁾、Ehrlich¹⁵⁾、Huber¹⁶⁾、Ehlich & Lindenthal¹⁷⁾等、最近では Webster¹⁸⁾、Fertman¹⁹⁾、Heubner²⁰⁾、Beaven²¹⁾、Jandi & Allen²²⁾、Hjelm & Verdier²³⁾等 Heinz小体を形成する種々の薬物を用いた動物実験、試験管内実験或いは臨床報告等は非常に多い。

また Heinz小体の化学的性質及びその形成機構に

ついては Itami & Pratt²⁴⁾, Hartwich²⁵⁾, Pappenheim & Suzuki²⁶⁾, 青木²⁷⁾, Fertman¹⁹⁾ 等の業績があり, Jung²⁸⁾, 東²⁹⁾, Rozsa & Spicer³⁰⁾ 等は電子顕微鏡を用いて研究している。Heubner²⁰⁾, Kiese & Seipelt³¹⁾, Schilling³²⁾, Fertman & Doan³³⁾, 青木²⁷⁾ 等は Heinz 小体と血色素, Heinz 小体と造血臓器との関係について種々の角度から実験的研究を行い報告している。更に臨床面では近年先天性溶血性貧血の1つである遺伝性ハイツ小体貧血 (hereditary Heinz-body anemia) の報告例³⁴⁾³⁵⁾³⁶⁾が急増し, 最近の赤血球の生化学的・酵素学的知見の急速な進歩により, 赤血球の代謝機構, 赤血球膜の構造・代謝と溶血等多方面から病因が検討され注目されているが, まだ明確になっていない。

さて放射線の Heinz 小体形成に関する研究は1952年山本が家兎に X 線照射を行い, 或る線量に達すると流血中に Heinz 小体の出現することを発見報告³⁷⁾したことに始まり, 引き続いて, 山本³⁸⁾³⁹⁾, 草加⁴⁰⁾, 西下⁴⁰⁾, 重信⁴¹⁾, 高橋⁴²⁾, 斉藤⁴³⁾ 等により実験的研究がなされている。臨床的には山本³⁹⁾はビキニ環礁水爆実験の被爆漁船員の赤血球内に Heinz 小体の出現を確認し, 吉田⁴⁴⁾, 斉藤⁴³⁾は Heinz 小体試験管内促進法を行ない, 健康人に比し被爆者全例に促進した価を認めたと報告している。

上述の如く Heinz 小体に関する研究は多くの学者により種々な角度からなされ, 現在までおびただしい数の業績が報告されているにもかかわらずいまだ不明な事が多い。特にその化学的性状及び形成機構など明らかにされていない。

そこで私は Heinz 小体の生化学的性格を検索する目的で放射線及び薬物によつて形成した Heinz 小体より脂質を抽出し, これを微量の試料を短時間で分離分析する能力をもつ薄層クロマトグラフィー及びガスクロマトグラフィーを用いてその脂質成分を分析し, 脂酸構成を測定し, さらに各々の Heinz 小体形成法の間に脂質・脂酸構成上の差異があるか否かを比較検討した。

II. 実験材料並びに実験方法

1. 実験材料

ヘパリン添加により凝血を阻止した新鮮牛血液 2000 ml を用い, 3000 回転, 30 分間遠心分離を行った。上部の血漿, 白血球及び血小板の層を除去し, 更にその赤血球成分を生理的食塩水で洗浄, 遠沈を繰り返し赤血球粥を得た。

2. Heinz 小体形成法

1) 薬物による Heinz 小体形成

Heinz 小体形成は試験管内で試み, 薬物としては苛性ソーダで中和した塩酸ヒドロキシルアミンの生理的水溶液を用いた。赤血球粥に約倍量の生理的食塩水を加え, 元の血液量と等量にし, 中和した塩酸ヒドロキシルアミンをほぼ 1/50 M 濃度に加えた。37°C, 24時間放置後100%の Heinz 小体形成をみた。

2) X 線照射による Heinz 小体形成

赤血球粥に生理的食塩水を加え, これをシャーレに入れ, 一坐全量 3000RX 線照射し, 37°C, 24時間放置後ほぼ100%の Heinz 小体形成を確認した。

X 線照射条件: 東芝製 KXC-18型深部治療装置使用, 管電圧 200KVp, 管電流 25mA, 濾過板 0.5mmCu + 0.5mmAl, 距離 50cm, 半価層 1, 36mmCu, 線量率 72R/min。

3. Heinz 小体並びに赤血球礎質の分離

対照として無処置の赤血球粥 (Packed erythrocytes) を用い, 他は前述の Heinz 小体形成法によつてほぼ 100%の赤血球内に 1~数個の Heinz 小体を産出した赤血球粥を用いた。Bernstein⁴⁵⁾の方法に従つて各々の赤血球粥にその10容ないし20容の水を加えて溶血をおこし, 遠心分離によつて赤血球礎質 (stroma, ghosts) を得た。赤血球礎質から hemoglobin をできるだけ除くために大量の水で赤血球礎質がほとんど純白になるまで洗浄を繰り返した。

Itami & Pratt²⁴⁾, 青木²⁷⁾は得られたこれらの沈渣が遊離の Heinz 小体およびこれを含有した赤血球細胞膜の集りであると述べているが, 私もこれらの沈渣を methyl violet で染色し鏡検したところ全く同様の結果を得た。

4. 脂質抽出法

遊離 Heinz 小体及び Heinz 小体を含有した赤血球膜の集りである沈渣に Folch 法⁴⁶⁾に従つて各々20倍容量の chloroform : methanol (2 : 1, v/v) を加え, 室温で一昼夜放置し, No. 5 A の脱脂濾紙にて濾過した。濾液に 0.2容の 0.73% 食塩水溶液を加えて激しく振盪混和し, 一昼夜静置して2層に分離した。非脂質性の上層 (methanol 水層及び境界面の fluff 層) をすてて夾雑物を除去し⁴⁷⁾, 下層 (chloroform 層) を窒素気流下で 42°C 減圧濃縮乾固し総脂質を分離した。

5. 薄層クロマトグラフィー (TLC)

1) 材料と装置

吸着固定相として薄層クロマトグラフィー用 Silica Gel G (Merck) を用い, 薄層クロマトグラフ

イー装置は adjustable applicator (Stahl), ガラス板 20×20cm, 展開槽 29×27.5×10cm (YAZAWA 製) を使用した。densitometer はデンスitomaster 8 型 (アタゴ製) を用いた。

2) 方 法

i) 試料 試料脂質は前述の Folch 法により抽出した総脂質を窒素中に保存し使用した。

ii) クロマトプレート Silica Gel G 1 容に蒸留水 2 容を加え均一になるように攪拌し、それを applicator を用いて手早くガラス板に塗布した。薄層の厚さは約 250 μ 前後とした。

一夜風乾したものを使用直前に 120°C, 1 時間加熱活性化し、放冷後試料液を着点して溶媒で展開した。

iii) 展開 これらの試料に対し第1溶媒 chloroform: acetone: methanol: 酢酸: 水 (25: 12: 6: 6: 3, v/v), 第2溶媒 n-hexane: ethyl ether: 酢酸 (55: 5: 0.34, v/v) が最もすぐれた分離能を示したので展開溶媒としてこれらを使用した。試料脂質を chloroform: methanol (4: 1, v/v) で溶液とし、chromatoplate の下端から 2 cm 離れた原線上へ連続して帯状にスポットした。展開槽を十分溶媒で飽和してから展開槽中の展開溶媒に plate の下端をつけ、密閉して原線上まず第1溶媒で 5 cm 展開後風乾し、更に第2溶媒で 10 cm の高さまで上昇法で二重展開した。展開温度は室温とした。分離したスポットを同定するために市販の標準物質を同一 plate に着点して展開した。

iv) 検出 5% phosphomolybdate in ethanol 溶液 (w/v) を使用直前に調整して 20×20cm の chromatoplate に約 20cc 噴霧し、150°C 5 分間加熱して発色させた。

v) 記録 発色後の chromatoplate を Fuji Minicopy Film に撮影し記録保存した。

vi) 定量 各脂質成分を発色させた chromatogram を直接 densitometer にかけて定量した。

また Fuji Minicopy Film に撮影し、SAKURA GRAVURE FILM にプリントして densitometer にかける方法も試みた。

6. ガスクロマトグラフィー (GLC)

1) 脂肪酸のケン化及びメチルエステル化

抽出した各脂質にそれぞれ 2 N-KOH methanol 溶液を試料赤血球破質の 10 倍量加え、容器は高純度窒素ガスで満たし、還流冷却器をつけて温浴上で 70°C 3 時間水解を行なった。ケン化後ほぼ等量の蒸留水

を加え、さらに石油 ether を加えて激しく振盪し不ケン化物を除去した。6N-HCl で酸性化 (pH1~2) した後 ethyl ether で遊離した脂肪酸を抽出分離した。次に nitrosomethylurethan にアルコールカリを作用させて diazomethane を合成し⁴⁸⁾、ドラフト中で ether 溶液中の遊離脂肪酸に diazomethane を作用させ常温でメチルエステル化した⁴⁹⁾。

2) ガスクロマトグラフィーによる分析

装置は島津製 GC-IB 形、水素焰イオン化ディテクタ付高感度ガスクロマトグラフを用い、分析条件は下記の如くである。試料の送入はメチルエステル化した脂肪酸を acetone に溶かし、Hamilton 製マイクロシリンジを用いて 1.0~1.5 μ l 出来る限り瞬間的に刺入した。

脂肪酸の同定は市販標準物質を用いて試料と同一条件でガスクロマトグラフにかけ、保持時間を比較し、また試料と混合してガスクロマトグラフにかけてピークが一致し、その成分の比率が増加することを確認して行なった。試料中の脂肪酸相互の相対量は半値幅法で測定計算した。

分析条件:

装置: 島津 GC-IB 型、水素焰イオン化検出器付
カラム: 4mm ϕ ×2.25m, 充填剤は 60~80 Mesh の Celite に Diethylene glycol succinate polyester を 15% coating したものを使用、窒素ガス 90 ml/min. 入口圧 3.0 kg/cm², カラム恒温槽温度 200°C.

試料気化室温度: 240°C.

検出器恒温槽温度: 220°C.

III. 実験成績

1. 薄層クロマトグラフィーによる分析成績

X 線照射及び hydroxylamine によつて形成した Heinz 小体より抽出した脂質、対照として無処置の牛赤血球膜より抽出した脂質及び標準物質の thin layer chromatogram が Fig. 1 である。

総脂質は 9 成分に分離することが出来、その各成分は、同様の方法で分析し硅胶カラムクロマトグラフィー、赤外線吸収スペクトル分析の結果などから同定している荒木の研究⁵⁰⁾⁵¹⁾及び R_f 値、標準物質を同一プレートに着点して展開しスポットを比較することにより次のように同定された。Peak 2. コレステロールエステル, 3. トリグリセリド, 4. 非エステル型脂肪酸, 5. コレステロール, 6. ホスファチジルエタノールアミン, 7. レシチン, 8. スフィンゴ

Table 1 Percentage total lipid composition (I)
and Phospholipid composition (II)

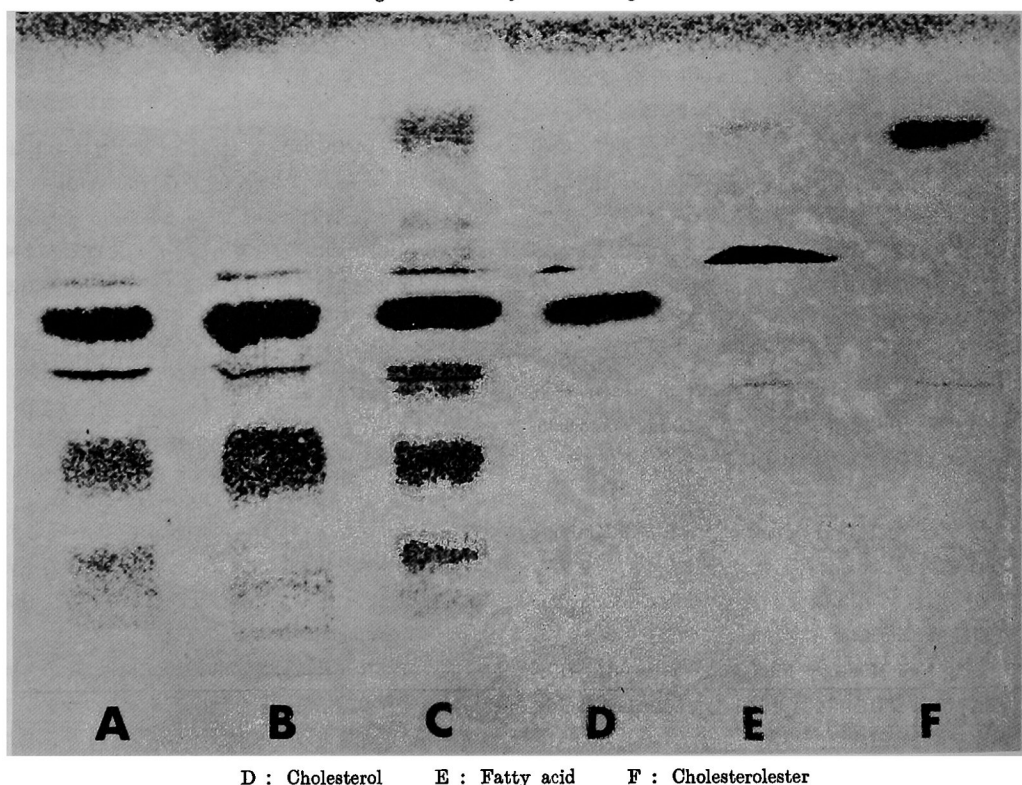
Lipid	A		B		C	
	I	II	I	II	I	II
Cholesteroleser	18		20		21	
Free fatty acid	2		2		3	
Cholesterol	34		33		29	
Phospholipid	46		45		47	
Phosphatidyl-ethanolamine		12		9		30
Lecithin (+Phosphatidyl-serine)		63		72		42
Sphingomyelin		19		14		26
Lysolecithin		6		5		2

A : Lipids extracted from Heinz bodies (X-irradiation)

B : Lipids extracted from Heinz bodies (Hydroxylamine)

C : Lipids extracted from untreated erythrocyte ghosts

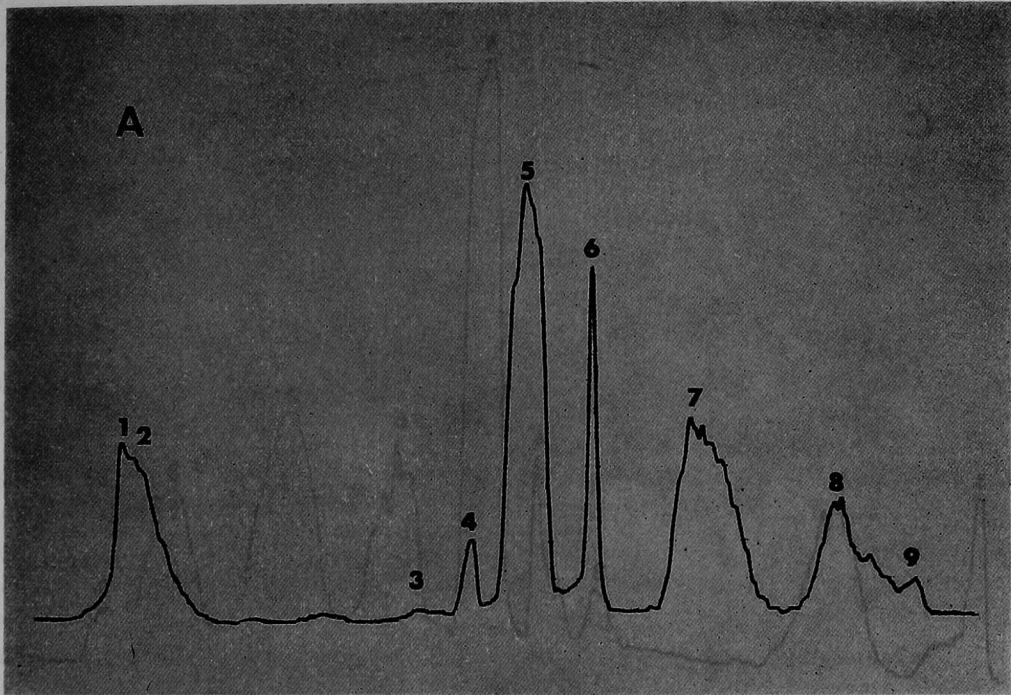
Fig. 1 Thin layer chromatogram



ミエリン, 9. リゾレシチン, それらの densitogram は Fig. 2. 3. 4 の如くで, 各々の脂質構成比を全脂質, リン脂質中の百分率で示すと Table 1 の如くである. 主な脂質構成比を比較してみると, Heinz 小体よ

り抽出した脂質は対照に比し, リン脂質中のホスファチジルエタノールアミン比の著明な減少が見られ, リゾレシチン比は増加している. 他にレシチン画分が増加しているのが認められるが, ホスファチジル

Fig. 2 Densitometry of thin layer chromatogram (Fig. 1, A)



Peak 1. 2. fat, cholesteroles, Peak 3. triglyceride, Peak 4. free fatty acid, Peak 5. cholesterol, Peak 6. Phospatidyl ethanolamine, Peak 7. lecithin, Peak 8. sphingomyelin, Peak 9. lysolecithin.

Fig. 3 Densitometry of thir layer chromatogram (Fig. 1, B)

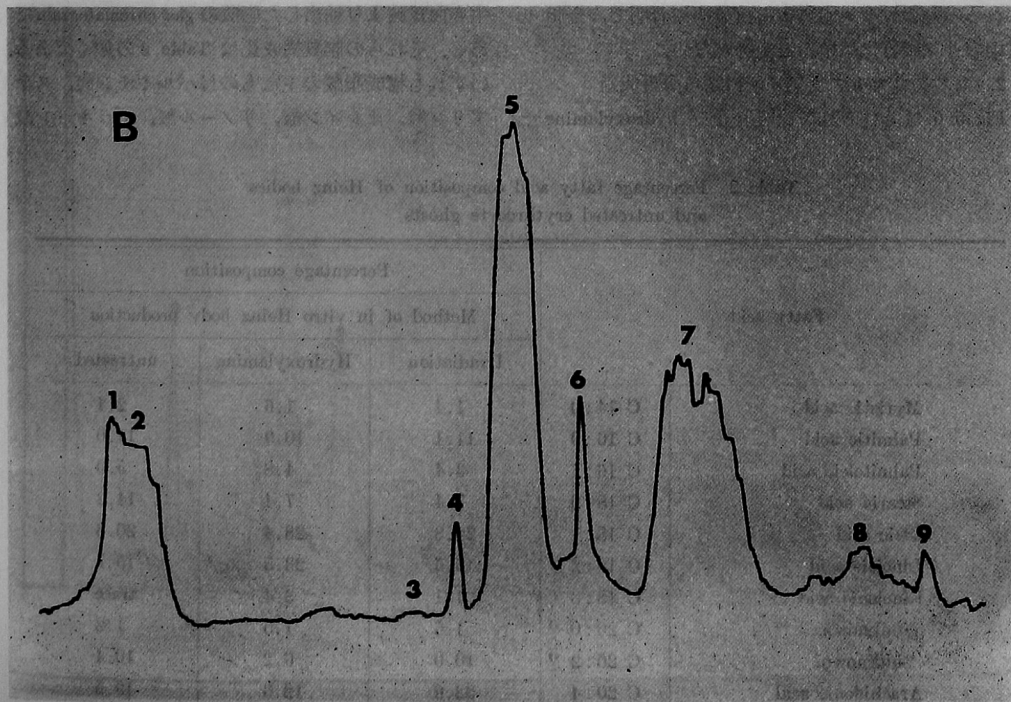
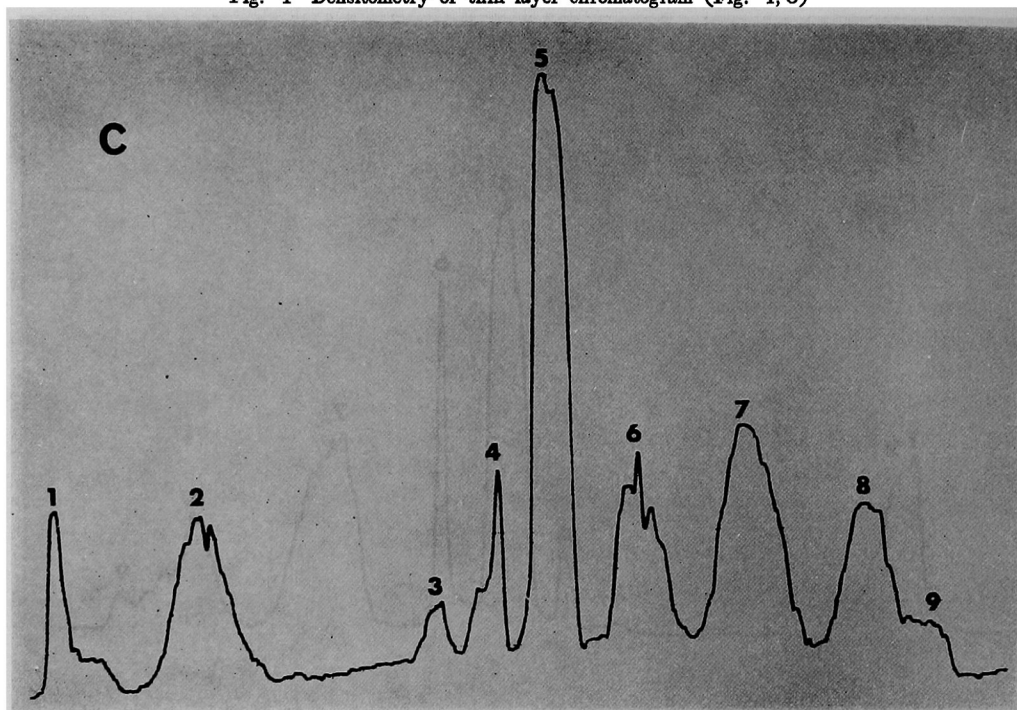


Fig. 4 Densitometry of thin layer chromatogram (Fig. 1, C)



セリンとの分離が悪く明らかでない。2つの Heinz 小体形成法の間にも構成比において差が見られるが、これらの差異はリン脂質中の百分率に著明で、全脂質中のリン脂質比は殆んど変動がない。

2. ガスクロマトグラフィーによる分析成績

Fig. 5. 6 はそれぞれ X 線照射及び hydroxylamine

によつて産出せる Heinz 小体より抽出した脂酸の gas chromatogram で、Fig. 7 は対照として無処置の牛赤血球膜より抽出した脂酸の gas chromatogram である。それらの脂酸構成比は Table 2 の如くである。いずれも構成脂酸の主なものにはパルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸

Table 2 Percentage fatty acid composition of Heinz bodies and untreated erythrocyte ghosts

Fatty acid		Percentage composition		
		Method of in vitro Heinz body production		
		Irradiation	Hydroxylamine	untreated
Myristic acid	C 14:0	1.4	1.6	2.1
Palmitic acid	C 16:0	11.1	10.9	11.0
Palmitoleic acid	C 16:1	3.4	4.8	5.0
Stearic acid	C 18:0	7.4	7.4	14.2
Oleic acid	C 18:1	24.8	28.4	20.8
Linoleic acid	C 18:2	16.6	23.5	15.7
Linolenic acid	C 18:3	1.1	3.4	trace
unknown	C 20:0 ?	1.6	1.5	1.2
unknown	C 20:2 ?	10.0	6.2	10.4
Arachidonic acid	C 20:4	22.6	12.3	19.5

Chromatogram A displays 10 numbered peaks. The x-axis is labeled '3000 R. 1/42/81' and the y-axis is labeled 'STANDARD' and 'CHART SATI02'. The peaks are numbered 1 through 10.

Fig. 6 Gas chromatogram of fatty acid extracted from Heinz bodies (Hydroxylamine)

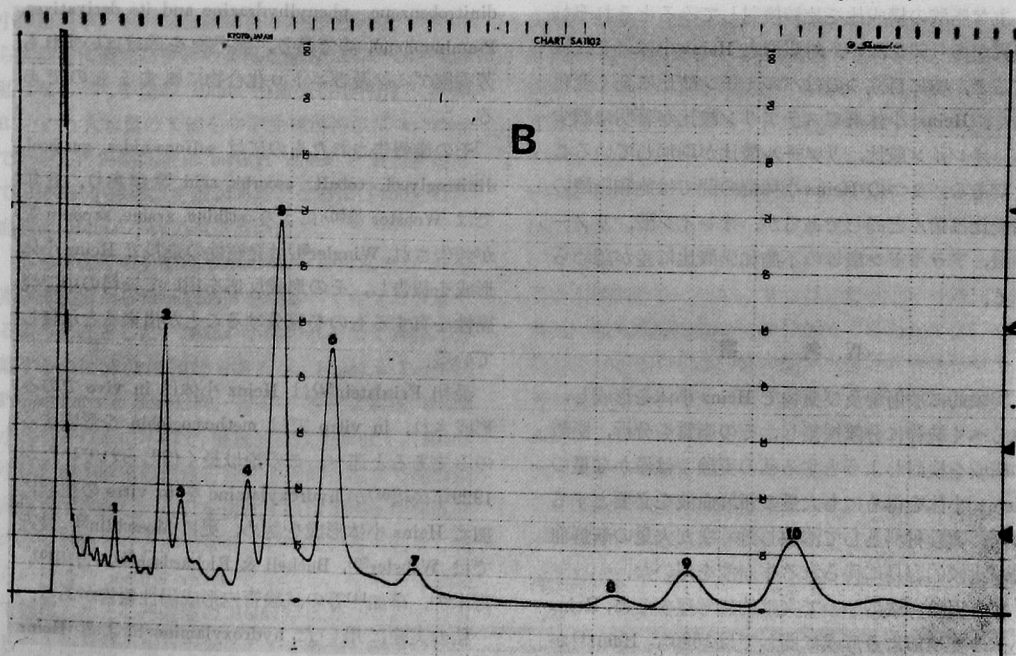
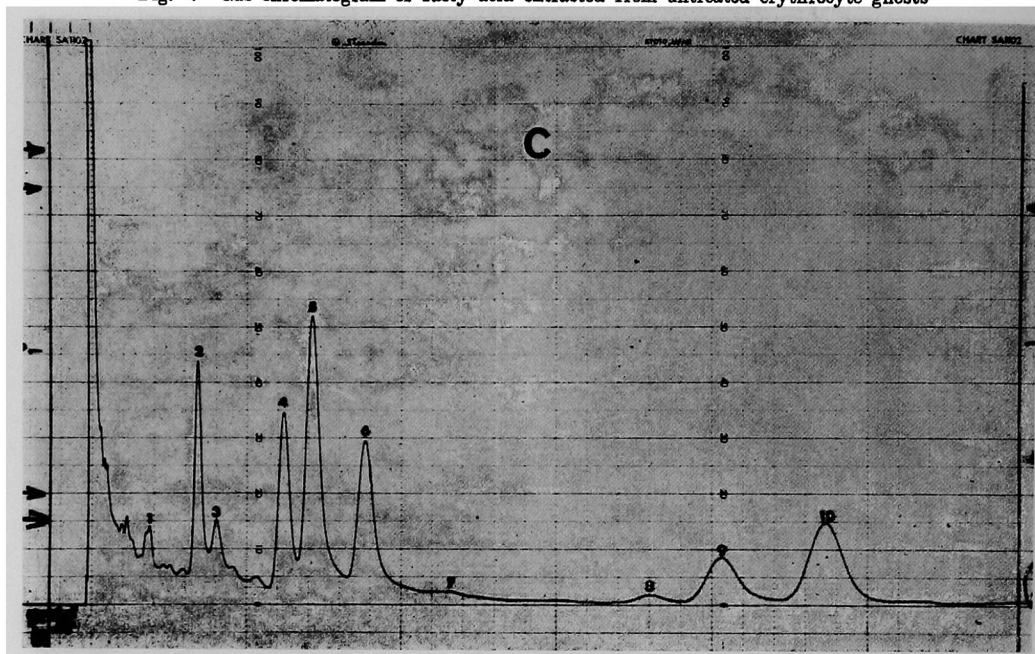


Fig. 7 Gas chromatogram of fatty acid extracted from untreated erythrocyte ghosts



であり、パルミトオレイン酸は比較的少く、ミリスチン酸、リノレン酸は更に少量である。

ほかにかなりの量の $C_{20:0}$, $C_{20:2}$ (unknown) と考えられる脂酸が認められた。

主な脂酸の構成比を比較検討してみるとそれぞれ相異があり興味深い。対照群と Heinz 小体群を比較すると、特に目立つのはパルミチン酸比に全く変化なく、Heinz 小体群でステアリン酸比が著明に減少し、オレイン酸比、リノール酸比が増加していることである。2つの Heinz 小体群の間では飽和脂酸の構成比は殆んど同じであるが、オレイン酸、リノール酸、アラキドン酸等の不飽和脂酸比に差が認められる。

IV. 考 察

実験的に放射線及び薬物で Heinz 小体を形成し、成るべく純粋に分離採集し、その脂質を分析、脂酸の構成を検討しようとする私の実験では僅かな量の Heinz 小体を得るにも大量の新鮮血液を必要とするので、実験材料として溶血し難くまた大量の新鮮血液が比較的容易に得られる牛血液を用いた。

私の実験方法について文献的に考察するに、Heinz 小体の薬物による形成に関しては1890年 Heinz¹⁾が phenylhydrazine 及びその誘導体の中毒において本小体を発見して以来幾多の動物実験、試験管内実験

或いは臨床報告等があり、現在本小体を形成する薬物として知られているものは、初期の研究中では無機物では hydroxylamine と chlorates, 有機物では aniline, toluidine, toluylene diamine, nitrobenzene, dinitrobenzene, phenylhydrazine and its derivatives, P-aminophenol 等であり、無機物を除けばいずれも芳香族アミノ及びニトロ化合物に属するものである。

その後報告されたものには sulfonamides, guajacol, dinitroglycol, cobalt, ascorbic acid 等があり、近年では Webster 等⁵⁰⁾により stibine, arsine, saponin 等が報告され、Wingler⁵¹⁾は発癌性の染料で Heinz 小体形成を報告し、その形成反応を用いて染料の中で発癌性を有するものを見分けることが出来ると示唆している。

最初 Friedstein⁵²⁾は Heinz 小体は in vivo でのみ形成され、in vitro では methemoglobin を形成するのみであると述べ、この説は長く信じられていたが、1929年高橋⁵³⁾が hydroxylamine を in vitro の血液に加え Heinz 小体形成を認め、更に Moeschlin⁵⁴⁾、最近では Webster⁵⁰⁾、Buckell & Richardson⁵⁵⁾、吉田¹⁰⁾、青木²⁷⁾、草加¹⁴⁾等の試験管内形成陽性報告がある。

私の実験に用いた hydroxylamine による Heinz 小体形成実験は Lewin⁴⁾が試験管内で hydroxylamine 処置による赤血球内に顆粒形成を観察して以来多数

の報告があり、Webster⁵⁰⁾等は無機物では hydroxylamine が最も強力な形成作用を持つており、in vitro よりも in vivo で形成され易いのは生体内の方が Heinz 小体形成により適した状態にあるためであろうと述べている。青木²⁷⁾は試験管内実験では一般に薬品添加後 37°C に保存することが本小体形成に効果的であり、生理的食塩水で充分洗滌した 50% 血球遊液を用いた方が脱線維血液をそのまま用いるよりも Heinz 小体形成が促進せられる傾向にあることを認めている。私も青木の方法を試み、Heinz 小体を形成する薬物として塩酸 hydroxylamine を用いたが、methyl violet で染色検鏡したところ殆んど 100% の赤血球に 1 ~ 数個の Heinz 小体出現を確認し得た。

放射線による Heinz 小体形成に関する報告は私の知り得た限りでは外国文献には全く見当らず、ただ 1954 年 Fertman¹⁹⁾が予備実験でマウスに X 線 700R 全身照射を行ない、48 時間後にその末梢血を brilliant cresyl blue で染色し検鏡している。しかしこの時には Heinz 小体形成は認められておらず、ただ放射線照射の如き物理的な原因によつても Heinz 小体形成の可能性を示唆しているにすぎない。

1952 年山本が家兎に X 線照射を行い流血中に Heinz 小体の出現を発見して以来、教室では Heinz 小体と放射線の関係を主として放射線障害と Heinz 小体出現率、放射線血液障害の診断への利用の面から実験的に研究し多数の業績を発表している。今回私はなるべく多量の Heinz 小体を得る目的で 3000 R という大線量の X 線を牛赤血球遊液に in vitro で照射し、24 時間後に methyl violet で染色検鏡して Heinz 小体形成を確かめたところはほぼ 100% の赤血球に Heinz 小体出現を認めた。

赤血球礎質の分離は Bernstein⁴⁵⁾の方法で行ない、赤血球礎質から hemoglobin をなるべく完全に分離するように注意した。Heinz 小体のみを全く純粋に分離するのは非常に困難であるが、Itami & Pratt²⁴⁾、Pappenheim & Suzuki²⁸⁾、青木²⁷⁾等によれば Heinz 小体自身は水に不溶で、機械的抵抗力が強く、Heinz 小体形成 100% の血液を数回生理的食塩水で洗滌後蒸留水で溶血し、これを遠沈すれば Heinz 小体成分のみを集めることが出来るといっている。私もこれらの沈渣を methyl violet で染色し、位相差顕微鏡で観察したところ遊離の Heinz 小体及びこれを含有した赤血球膜の集りであることを確認し得た。

Ponder⁵⁶⁾によれば赤血球礎質の収量は溶血液の pH と温度により影響され、pH は約 5.5、温度は低温

の方が収量が大きであると述べているが、私が得た Heinz 小体含有赤血球礎質の収量は大体同一条件で、hydroxylamine によるものの方が放射線照射により Heinz 小体を形成したものより多く、無処置の Heinz 小体を全く含有しない赤血球礎質が最少であった。これは 1 つには形成された Heinz 小体の容量の多少によるものと思われる。

次に脂質の分析方法について考察してみると、抽出は現在最も広く利用され、総脂質の定量的抽出に適している Folch 法⁴⁶⁾を用いた。

非脂質成分の除去に水洗法を用いたが、この方法は比較的的非極性溶媒に難溶で水に可溶性の磷脂質が水に溶解し失われる可能性があるのが欠点とされている。

Thin layer chromatography による分析の際には適切な溶媒系の選定が分離性向上の大きな要件となつており⁵⁷⁾、分離しようとする脂質、分離の目的、あるいは薄層の種類などによつて使用する溶媒系が異なり、最も安定した分離能を示す溶媒をそれぞれ経験的に見出す必要がある。私も非極性脂質を主体とする脂質各種と複合脂質群との分離には n-hexane: ethylether: 酢酸 (55: 5: 0.34, v/v) を用い、複合脂質の分離には chloroform: acetone: methanol: 酢酸: 水 (25: 12: 6: 6: 3, v/v) を用いて二重展開する方法を試み、展開溶媒中の各々の比率は経験的に決定したが、展開法、検出法、スポット定量法などそれぞれ重要な諸条件が加わり再現性は必ずしも良くない。しかし各試料間の大体の傾向はつかみ得たと考えている。荒木^{58, 59)}は thin layer chromatography による血漿脂質の分析方法とその再現性に関係している諸条件、定量化への試みなどについて検討している。そして血漿脂質の展開方法として 2 重展開法を行ない、9 つの主要成分に分画しており、私も展開溶媒の比率をかえて応用したが、この方法は各成分相互の量的関係を検討できる特長をもっているがカロチノイドとコレステロールエステル、コレステロールとジグリセリドおよびレシチンとホスファチジルセリンの分離は不十分であると述べている。今回の実験結果もレシチンとホスファチジルセリンの分離が悪い。さらに定量に関しては一定条件下で隣モリブデン酸発色、densitometry をおこない、試料が約 200 μ g までは直線的関係であつたと述べており、成末⁶⁰⁾も荒木の方法を応用し脂質の定量を試みている。私は各脂質成分を発色させた chromatogram を直接 densitometer にかける方法と

Fuji Minicopy Film に撮影し、ついで SAKURA GRAVURE FILM で反転し posi-film を作成、これにつき densitometry を行なつたが得られた結果はほぼ同様であつた。

Gas chromatography による脂質分析の際には脂酸の抽出法、水解条件、自動酸化の有無等試料を gas chromatography 装置にかけるまでの種々の操作でかなり高級脂酸に変動があるようである⁽⁴⁹⁾⁽⁶¹⁾。私も脂酸の抽出、水解は窒素気流下で行ない、試料の保存に際しても脂酸が酸化変質されぬ様注意した。

さて私の実験成績を一見するに、同じ染色性を有し、染色標本では全く同一の如くに観察される Heinz 小体もその形成方法によつて脂質及び脂酸の構成にそれぞれ相違があるのが認められる。即ち、Heinz 小体はある種の共通の性質を持つた類似の変性産物で、必ずしも同一なものではないと考えられる。このことは Heinz 小体の成因、化学的組成あるいはその生物学的意義を考察する際にはなほだ興味ある問題と思われる。

今回の私の実験の如く、Heinz 小体の脂質、脂酸を分析検討した報告は私の知り得た限りでは、内外を問はずまた方法の如何にかかわらず全く見当らないので、その脂質、脂酸構成など比較検討することは不可能である。

しかし赤血球膜の脂質に関する研究は多く、生化学的な面から生体膜の構造と膜透過という重要な生命現象を解明するため、最近この方面の研究が活発に行なわれている。Williams⁽⁶²⁾等はヒト赤血球膜の組成を分析し、Dodge⁽⁶³⁾、Reed⁽⁶⁴⁾等はヒト赤血球膜の脂質について生化学的研究を行ない、リン脂質を thin layer chromatography を用いて分析している。分析方法や条件の違いで必ずしも諸家の報告値は一致していないが、大体リン脂質60%、コレステロール30%、中性脂肪10%である。

Dowson⁽⁶⁵⁾等は各種動物の赤血球膜中のリン脂質を分析し、De Gier & Van Deenen⁽⁶⁶⁾もリン脂質の代謝及び機能に関する一連の研究の中でヒト、ラット、ウサギ、ブタ、ウシ及びヒツジの赤血球膜の脂質構成をレシチンに注目して paper chromatography で分析しているが、今回の実験で対照群とした無処置のウシ赤血球膜の分析値は大体諸家の報告と一致している。

Turner⁽⁶⁷⁾等は反芻動物の赤血球はごく僅かしかレシチンを含まないことを見出し、このために溶血毒に対し抵抗性が強いのだと論じ、De Gier もこの見

解を支持している。私の成績ではレシチンとホスファチジルセリンの分離が悪く、この点に関しては不明であるが注目すべき報告と思われる。今回の実験も放射線照射による赤血球膜脂質・脂酸の変動、放射線照射の際の溶血機序等の問題と関係し、赤血球膜と溶血の面より検討すれば非常に興味深いと考える。

赤血球に大線量 (1×10^4 R 以上) の X 線、 γ 線を照射すれば in vitro で溶血現象を起こし、溶血に至らない程度の線量でも赤血球寿命の短縮を認めることは今日よく知られた事実であり⁽⁶⁸⁾⁽⁶⁹⁾、in vivo でも Kahn⁽⁷⁰⁾ 等は放射線貧血には溶血が関与していると報告しているが、その溶血機序は明らかでない。Lindemann⁽⁷¹⁾ は X 線溶血現象を詳細に検討している。それによれば赤血球膜面に一次的な変化が起り、これによつて透過性の変化が起り溶血現象を呈すると述べているが、いかなる変化かは不明である。

今回の Heinz 小体より脂質を分離分析した実験からは確証は得られないが、放射線照射により主に赤血球膜リポ蛋白質の酸化的変性により Heinz 小体を形成し、脂質成分に変動を来し溶血し易い状態となり、更に大線量の場合は溶血を起こすものと推察される。また、放射線障害の際に見られる貧血は造血機能の障害のみでなく赤血球膜脂質の変化による溶血抵抗の減弱も原因と思われる。この見解は、Kögl⁽⁷²⁾らが赤血球リン脂質の構成脂酸をガスクロマトグラフィーにかけて分析検討し、種々の溶媒による溶血時間がネズミ、ヒト、ウサギ、ブタ、ウマ、ウシ、ヒツジの順に延長し、同じ順に不飽和脂酸比が多いことから、膜の透過性に関係する因子に構成脂酸の二重結合の数が影響するのではないかと述べていることと一致する。私の実験で Heinz 小体の脂酸構成でステアリン酸比が減少し、オレイン酸比、リノール酸比が著明に増加し全体として不飽和脂酸比が対照群に比し多いことは、脂質分析においてホスファチジルエタノールアミン比の著明な減少と共に赤血球膜リン脂質の変化と溶血との密接な関係を推察せしめるもので注目すべきことと考える。

一方放射線照射に伴う脂質代謝の変化については多くの報告があり、動物に致死量の X 線照射を行なうと血漿中の脂質が増加し、脂質代謝の障害を示すことが知られている⁽⁷³⁾。

Schwarz⁽⁷⁴⁾等は X 線全身照射を受けたラットの肝リン脂質を分析し、グリセリン脂質の増加を報告している。妹尾・山本等⁽⁷⁵⁾は家兎に一座全量3000R全

身照射し、肝の脂酸構成を gas chromatography で分析し、照射後の肝は非照射対照の肝に比し、パルミチン酸比の減少、リノール酸比、オレイン酸比の増加を報告しており、勝俣⁷⁶⁾は β 線体内照射の際に各臓器構成脂酸の変動を経時的に追求し、Altman 等⁷⁷⁾は X 線照射後の骨髓の脂酸合成について α -14C アセテートを追跡子として用い、共に放射線照射によつて脂質代謝は変化し、脂酸構成も時間の経過と共に複雑に変動することを報告している。又照射を受けた動物では血漿中のリン脂質、コレステロール、脂酸などが増加するという多くの報告があり、Di Luzio⁷⁸⁾らによれば照射によつて死亡するものでは脂質の増加が強く、死亡するまで継続するが、生き残つたものでは 48 時間位からコレステロール、リン脂質などが正常値に近く、全脂質、中性脂肪なども増加の度が少なくなつてくる。1000 R 照射、24 時間後のウサギでは、血漿中のコレステロールが 70~80%，リン脂質が 140~190% 増加していると述べている。私の脂質分析の結果では、なんら処置しないウシ赤血球膜脂質と in vitro で 3000 R X 線照射後得た多量の Heinz 小体を含む赤血球膜脂質の間に、脂質成分構成比ではリン脂質中のホスファチジルエタノールアミン比の著明な減少を認め、他にレシチン+ホスファチジルセリン比、リゾレシチン比の増加を認めたが、リン脂質全体としては著明な変動はなく、コレステロール比も僅かに増加しているのみである。しかし各脂質成分は X 線照射によりそれぞれ絶対量は増加していることが推測される。

さて、上述の如く放射線照射と脂質代謝に関する報告は多数見られるが、今回の実験のように放射線照射により Heinz 小体を形成し、その脂質を分析した報告は全く見当らず、ただ森等⁷⁹⁾は、この実験と時を同じくして γ 線照射 (in vitro) による赤血球膜脂質の変化と溶血との関係について学会報告を行なっているが詳報はない。森等によればウシ血球では γ 線照射によりホスファチジルエタノールアミンの著明な減少が見られ、それと関連を有するオレイン酸が影響を受けるらしいと述べており、私の実験成績と非常によく一致している。しかし ^{60}Co γ 線と X 線との間に Heinz 小体形成に及ぼす影響に差異は認められないことから Heinz 小体は当然形成されているはずであるが、Heinz 小体には全く言及せず赤血球膜脂質として分析を行なっている。

ところで Heinz 小体の化学的性質及びその形成機構に関する研究は多く、Itami & Pratt²⁴⁾が血液の醗

質沈渣が水に不溶で、その中に Heinz 小体を含むことを発見し、Hartwich²⁵⁾は血液中より Heinz 小体を分離採集する方法を見出し、種々の反応から Heinz 小体は蛋白質とおそらく脂質と思われる ether, chloroform で抽出される物質、鉄等を含むと述べている。Pappenheim & Suzuki²⁶⁾は Heinz 小体の存在は Heinz 小体含有赤血球の溶血抵抗を増加させると述べているが、この点に関しては異論が多く、確かでないが、Heinz 小体そのものは saponin 等の溶血毒に対して抵抗性が強い。Warburg 等⁸⁰⁾は phenylhydrazine により生じた Heinz 小体はその性質が変性グロビンに一致していることを示し、Heubner も本小体は赤血球原形質から出来るものであるといい、

Dustin もこれを支持し、Lemberg & Legge も変性グロビン説を主張し、Jandl 等は Heinz 小体はヘモグロビンの酸化的変性産物であると述べている。更に Kiese & Seipelt は Heinz 小体は赤血球膜から出来る変性蛋白であると述べ、Jung の電子顕微鏡による研究も本小体が赤血球膜から生成する変性蛋白であるということを支持している。青木は種々の実験結果から赤血球膜蛋白質の酸化的変性であると考へている。Rozsa & Spicer の電子顕微鏡による研究でも変性グロビン説は否定されている。

最後に私の見解では、Heinz 小体形成という現象は、薬物、放射線等の酸化作用により赤血球膜リポ蛋白質の酸化的変性により不可逆的に新しく形成された小体で、その作用が血球内部に及ぶ場合には、原形質からも類似の変性産物が形成されるものと推察される。

そして今回の実験成績より Heinz 小体の組成は変性蛋白のみでなく、脂質成分を含有し、その成因や化学的組成は必ずしも一定のものでなく、種々の反応条件で類似の変性産物として作られたものであり、塩基性色素の超生体染色により鮮明に紫青色に染まる共通の性質を有するものである。又 Heinz 小体の出現は、赤血球膜リポ蛋白質に変化のあることを反映しているもので、更に進めば溶血に至ることを示していると考えられる。

V. 結 語

放射線照射 (X-ray, 3000 R) 及び薬物 (hydroxylamine hydrochloride) によつて形成した Heinz 小体を分離採集し、その脂質を抽出して thin layer chromatography 及び gas chromatography を用いて脂質、脂酸構成を測定、無処置赤血球膜のそれと比

較, さらに各々の Heinz 小体形成法の間に構成上の差異があるか否かを比較検討し, 次の結果を得た。

1. 染色観察の際には全く同一に見える Heinz 小体も, その形成条件で脂質, 脂酸構成が異なる。即ち Heinz 小体の組成は変性蛋白のみでなく, 脂質成分を含有し, その成因や化学的組成は必ずしも一定のものでなく, 類似の変性産物として作られたものと考える。

2. Heinz 小体より抽出した脂質の成分構成比は, 対照群の正常赤血球膜抽出脂質と比較すれば, リン脂質中のホスファチジルエタノールアミンの著明な減少が認められ, 他にレシチン+ホスファチジルセリン比, リゾレシチン比の増加がみられた。

3. Heinz 小体の脂酸構成ではステアリン酸比が減少し, オレイン酸比, リノール酸比が著明に増加し, 全体として不飽和脂酸比が対照群に比較し増加

しているのが認められた。

4. 放射線貧血の発生は造血組織における赤血球再生機転の抑制以外に直接末梢赤血球の破壊促進もこれに関与しており, その末梢赤血球の脆弱化は放射線による赤血球膜脂質の変化に基くものであることが示唆された。

稿を終るにあたり終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った恩師山本道夫教授に深甚の謝意を表し, 併せて本研究に直接の御教示御援助を頂いた放射線医学教室田辺正忠, 勝俣直躬講師に感謝します。

本論文要旨は昭和42年4月岐阜市に於いて開催された第26回日本医学放射線学会総会に於いて発表した。

文

- 1)*Heinz, R.: Virch. Arch. path. Anat., 122: 112, 1890.
- 2)*Riess, L.: Berl. Klin. Wchnschr., 19: 785, 1882.
- 3)*Marchand, F.: Virch. Arch. path. Anat., 77: 455, 1879.
- 4)*Lewin, L.: Arch. exper. path. u. Pharmacol., 25: 306, 1889.
- 5) 下村 彰: 日本医事新報, 1474: 15, 昭27.
- 6) 羽山恒人: 日血会誌, 13: 194, 昭25.
- 7) Lemberg, R. & Legge, J. W.: Hematin compounds and bile pigment, Interscience Publishers. 524, 1949.
- 8) 吉田秀雄: 京府医大誌, 44: 457, 460, 昭24.
- 9) 吉田秀雄: 診療, 6: 603, 昭28.
- 10) 吉田秀雄, 河村源次: 日血会誌, 12: 184, 昭24.
- 11) 河村源次: 京府医大誌, 47: 315, 327, 昭25.
- 12) 直 太作: 京府医大誌, 47: 395, 昭25.
- 13) 直 太作: 日血会誌, 12: 184, 昭24.
- 14) 草加芳郎: 日医放会誌, 16: 488, 昭31.
- 15)*Ehrlich, P.: Verhandl. Kongr. inn. Med., 11: 33, 1892.
- 16)*Huber, A.: Virch. Arch. path. Anat., 126: 240, 1891.
- 17)*Ehlich, K. & Lindenthal, O.: Ztschr. Klin. Med., 30: 427, 1896.
- 18) Webster, S. H.: Blood, 4: 479, 1949.

献

- 19) Fertman, M. H. & Fertman, M. B.: Medicine (Baltimore), 34: 131, 1955.
- 20) Heubner, W.: Folia haemat., 67: 323, 1943.
- 21) Beaven, G. H. & White, J. C.: Nature, (Lond) 173: 389, 1954.
- 22) Jandl, J. H. & Allen, D. W.: J. clin. Invest., 39: 1000, 1960. 39: 1818, 1960. 40: 454, 1961.
- 23) Hjelm, M. & Verdier, C. H.: Biochem. Pharm. 14: 1119, 1965.
- 24) Itami, S. & Pratt, J.: Biochem. Ztschr. 18: 302, 1909.
- 25) Hartwich, W.: Folia haemat. Arch., 13: 257, 1912.
- 26) Pappenheim, A. & Suzuki, T.: Folia haemat. Arch. 13: 225, 1912.
- 27) 青木 宏: 日新医学, 41: 136, 昭29. 41: 230, 昭29.
- 28) Jung, F.: Klin. Wchnschr. 22: 42, 1943.
- 29) 東 昇, 脇坂行一, 水川 勇: 日血会誌, 12: 185, 昭24.
- 30) Rozsa, G. & Spicer, S. S.: Nature, 171: 84, 1953.
- 31) Kiese, M. & Seipelt, L.: Arch. exper. Path. u. Pharmacol., 200: 648, 1943.
- 32) Schilling, V.: Ztschr. Klin. Med., 108: 709, 1928.

- 33) Fertman, M. H. & Doan, C. A.: *Blood*, **3**:349, 1948.
- 34) Miwa, S. et al.: *ACTA HAEM. JAP.*, **28**: 593, 1965.
- 35) Shibata, S. et al.: *ACTA HAEM JAP.*, **26**: 164, 1963.
- 36) 三輪史郎: 代謝, **4**: 168, 昭42.
- 37) 山本道夫: 日医放会誌, **15**: 148, 昭30.
- 38) 山本道夫: 最新医学, **17**: 1111, 昭37.
- 39) 山本道夫他: 岡山医会誌, **69**: 103, 昭32.
- 40) 西下創一: 日医放会誌, **18**: 1178, 昭33.
- 41) 重信幸男: 岡山医会誌, **69**: 627, 昭32.
- 42) 高橋新一: 日医放会誌, **16**: 604, 昭31.
- 43) 斉藤哲郎: 岡山医会誌, **69**: 627, 昭32.
- 44) 吉田秀雄, 下村 彰: 日血会誌, **15**: 305, 昭27.
- 45) Bernstein, S. S. et al.: *J. Biol. Chem.*, **122**: 507, 1938.
- 46) Folch, J., Lees, M. & Stanley, G. H. S.: *J. Biol. Chem.*, **226**: 497, 1957.
- 47) 今井 陽, 坂上利夫: 脂質の生化学, 朝倉書店 **16**, 昭41.
- 48) 日本化学会編: 実験化学講座, 丸善, **20**: 375, 昭40.
- 49) 高橋善弥太: 最新医学, **18**: 2408, 昭38.
- 50) Webster, S. H., Liljegren, E. J. & Zimmer, D. J.: *J. Pharmacol. & Exper. Therap.* **95**: 201, 1949.
- 51) Wingler, A.: *Ztschr. Krebsforsch.*, **59**: 134, 1953.
- 52) Friedstein, D.: *Folia haemat., Arch.* **12**: 239, 1911.
- 53) 高橋次郎: 児科雑誌, **345**: 336, 昭4.
- 54) Moeschlin, S.: *Folia haemat.* **65**: 345, 1941.
- 55) Buckell, M. & Richardson, J. D.: *Brit. J. Indust. Med.* **7**: 131, 1950.
- 56) Ponder, E.: *J. Exper. Biol.*, **18**: 257, 1942.
- 57) 野田万次郎: 別冊 蛋白質核酸酵素, 脂質実験法, **3**, 1967.
- 58) 荒木英爾: 日新医学, **50**: 85, 昭38.
- 59) 荒木英爾: 日本臨床, **22**: 627, 昭39.
- 60) 成末允男: 岡山医会誌, **78**: 291, 昭41.
- 61) 高橋善弥太他: 別冊 蛋白質核酸酵素, 脂質実験法, **30**, 1967.
- 62) Williams, H. H., Erickson, B. N., et al.: *J. Biol. chem.*, **122**: 507, 1938.
- 63) Dodge, J. T., Mitchell, C., & Hanahan, D. J.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **100**: 119, 1963.
- 64) Reed, C. F., Swisher, S. N., Marinetti, G. V., & Eden, E. G.: *J. Lab. clin. Med.*, **56**: 281, 1960.
- 65) Dowson, R. M. C., Hemington, N., & Lindsay, D. B.: *Biochem. J.*, **77**: 226, 1960.
- 66) De Gier, J., & Van Deenen, L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta.*, **49**: 286, 1961.
- 67) Turner, J. C., Anderson, H. M., & Gandal, C. P.: *Biochim. Biophys. Acta*, **30**: 130, 1958.
- 68) Kunzer, W.: *Klin. Wschr.*, **31**: 715, 1951.
- 69) Elizabeths, A. C.: *Am. J. Physiol.*, **73**: 481, 1953.
- 70) Kahn, J. B. & Furth, J.: *Blood*, **7**: 404, 1952.
- 71) Lindemann, B.: *Fortschr. Roentgenstr.*, **75**: 523, 1951.
- 72) Kögl, E., De Gier, J., Mulder, L., & Van Deenen, L. L. M.: *Biochim. Biophys. Acta*, **43**: 95, 1960.
- 73) Rosenthal, R. L.: *Science*, **110**: 43, 1949.
- 74) Schwarz, H. P., et al.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **111**: 422, 1965.
- 75) Seno, S. & Yamamoto, M.: *Acta Med. Okayama*, **19**: 59, 1965.
- 76) 勝俣直躬: 岡山医会誌, **79**: 167, 昭42.
- 77) Altman, K. I., Richmond, J. E. & Salomon, K.: *Biochim. Biophys. Acta*, **7**: 460, 1951.
- 78) Di Luzio, N. R. & Simon, K. A.: *Rad. Res.* **7**: 79, 1959.
- 79) 森 信胤, 熊谷裕二, 有賀豊彦: 日本生化学会雑誌, **39**: 617, 昭42.
- 80) Warburg, O., Kubowitz, F., & Christian, W.: *Biochem. Ztschr.*, **242**: 170, 1931.
- [* は 18), 19) より引用]

Studies on the Nature of Heinz Bodies

Part 1. Biochemical Properties of Heinz Bodies

By

Yoshio HIRAKI

Department of Radiology, Okayama University Medical School
(Director : Prof. Michio Yamamoto)

Heinz bodies produced in vitro by X-irradiation or hydroxylamine hydrochloride were separated and collected. The lipids extracted from these Heinz bodies were analyzed as to their lipid and fatty acid composition by thin layer chromatography and gas-liquid chromatography. The purpose of the present experiment is to compare the composition of lipids and fatty acids in the Heinz bodies produced by the two different methods. In addition, the membranes of the untreated red cells were similarly treated and analyzed for comparison.

1. It was found that there were differences in the composition of lipids and fatty acids derived from Heinz bodies under different circumstances in which they were formed, even though they might appear morphologically identical on stained preparations. Namely, Heinz bodies contained a lipid fraction whose chemical composition was not necessarily the same and it was suggested that they were the degenerative products having the same characteristics.

2. Analysis of lipids of Heinz bodies indicated a marked decrease of the phosphatidyl ethanolamine ratio in comparison with the lipid fraction of the normal red cell membranes.

3. With respect to the fatty acid composition of Heinz bodies, there were a decrease of the stearic acid ratio and an increase of the oleic and linoleic acid ratios, resulting in a marked increase of the total unsaturated fatty acid ratio.

4. The development of X-irradiation anemia is due not only to an impaired erythropoiesis in the hematopoietic tissue but to an accelerated destruction of red cells in the peripheral blood. It is postulated that the peripheral red cells are rendered fragile by X-irradiation through an alteration of the lipid composition ratio of the cell membrane.
