

家兎皮下組織内における血色素の分解に関する研究

第 1 編

家兎皮下組織内に牛血液を注入した際の 血色素 heme 及び globin の変化に就て

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)

山 本 将 雄

〔昭和 34 年 5 月 8 日受稿〕

緒 言

生体皮下組織内に血液を注入し血色素の分解過程を組織化学的に研究したのは H. Fischer & F. Reindel (1923), A. R. Rich & J. H. Bumstead (1925), 林らにより始まる。教室難波, 西信らは鉄反応並に胆汁色素の化学反応を組織化学的検査法に応用し血色素の分解過程を詳細に追及したが, それらは全て heme 側についてのみで globin については何ら考慮が払われなかつた。一方血色素の分解過程に於ける globin の意義については heme の分解に先だち globin の変性を来すと言う考えと分解時変性を起さないとの考えとは R. Lemberg と G. Barken との間に鋭く対立したが, 教室人見は globin の変性を polarograph 法により教室正岡は血清学的方法により夫々検討した結果前者の正しいことを立証した。最近上代教授及びその一門は perturbation なる概念を導入して heme の分解には可逆的な軽微な変性が globin に先づ起る事が前提であることを提唱した。しかしながらこれらは凡て試験管内における血色素分解過程, 謂わば生体内における分解過程の模型実験により得られた成績にすぎない。又血色素の分解に伴い bilirubin が生成される際なお globin が結合して bilirubin-globin として存し間接 diazo 反応を呈するとの考えがある。即ち R. Duesberg は 1934 年この説を提唱したが, K. O. Pedersen & J. Waldenstroen により間もなく否定された。その後 N. Fiessinger, A. Gejdos & M. Polononsk らによる各種の実験成績は C. J. Watson の肯定するところとなり再び広く採用されるに至つた。然し教室の正岡, 長島等はこれらの説に何らの根拠のないことを実験的に証明して反対し

ている。

以上の如く生体内における血色素の分解には heme 側の分解にとどまらず globin 側の態度についてもなお十分検討を加える必要がある。著者は生体皮下組織に血液を注入して heme の分解過程を組織化学的に追及する一方血清学的方法を採用して globin の変化をも同時に追及し, 彼此比較検討を加え上記の論点を追及した結果興味ある成績をえたので報告する。

実験材料並びに方法

実験材料

1. 血色素の調製並に濃度測定法

牛血液より教室永井の方法により調製しその濃度は L. Heilmeyer, 平出の変法により測定した。

2. 抗血色素血清の調製法

濃度 10 g% の血色素液を 5 倍に稀釈しこれに等量の alumina cream を加えてよく混じその 5 cc を健康雄性家兎の大腿筋肉内に 2 日の間隔をもつて約 10~15 回注射し, 最終注射後 1 週間を経て十分抗体価の上昇するのをまつて型の如く頸動脈より全採血後血清を分離し, 56°C 30 分加温で非働化した。抗血色素血清の力価の測定は抗原稀釈法により行い, 実験には抗体価 6,400 倍のものを使用した。

3. 実験動物

実験には体重 2 kg 以上の成熟雄性家兎を使用した。

4. 注入用血液

新鮮な牛血液に 0.4% の割に枸橼酸曹達を加えて使用した。

実験方法

牛血液 1.0 cc 宛を家兎大腿内側皮下に数ヶ所注

射した後生じた血腫を日を追つて摘出し、その一部を組織学的検索にあてると共に他の部に生理的食塩水 1.5 cc を加え、乳鉢で摺りつぶし、次で 3,000 回転遠心沈澱を行い、その上清を抗原として血色素 globin を測定した。なお血腫摘出にはメスを用い予め形成した血腫全部を摘出し得る如く極力努めた。なお対照として同一家兎の大腿について血腫摘出時同時に健康部位の組織を同一の大きさに摘出し上記同様の操作を行つて対照とした。又被検家兎の血液 1 cc を血腫摘出時同時に耳静脈より採血し型の如く血清を分離した後、本血清を抗原として抗血色素 globin 血清との間に上述の如く沈澱反応を試み、血清中に牛血色素 globin の流出状態を繰返し測定した。

組織学的検索法

教室難波、西信の行つたと同様に伸展標本を作成して顕微鏡下に観察すると共に鉄反応及び Gmelin, Diazo, Aldehyde, Schlesinger 氏醋酸亜鉛反応、塩酸反応を併用して色素の本態を極力糾明するように努めた。

血色素 globin 測定法

血清学的に沈澱反応を応用して上述の抗血色素血清を使用し組織抽出液上清を抗原として抗原稀釈法により沈澱価を以て血色素量を表示した。この際得られた血色素量値は血色素中の globin の値であることは既に上野、教室の正岡、長島らの証明した通りである。

実 験 成 績

1. 血色素 globin の消長

牛血液を家兎皮下組織内に注入した後日を追つて該組織の血色素 globin の消長を観察すると第 1 表の通りとなる。即ち注入第 2 日目より最高値に達した後、注入後 15 日に至るも何らその値に変動を見ない。なお念のため同一家兎について注入の行われなかつた部位の皮下組織についても同様 globin の消長を検したところ、第 2 表の如く注入第 8 日以後軽度の上昇を見たが第 1 表の値に比べるべくもない。又被検家兎流血液中の牛血色素 globin の消長を検したが第 2 表の如く著明な変化は見られなかつた。

2. 組織学的観察

注入後 24 時間

肉眼的には暗紫青色半流動性で、周囲の組織には殆んど着色はない。この血腫辺縁を周囲組織と共に伸展標本とし、鏡下に観察すると血腫周辺部には未

第 1 表 牛血液を家兎皮下組織中に注入した際の家兎皮下組織内血色素 globin の消長 抗原稀釈〇

注射後	例 沈澱 素価	I	II	III	IV
		第 1 日	8,000	8,000	7,200
2		32,000	8,000		8,000
3			32,000	28,800	
4					32,000
5		32,000			
6			32,000	28,800	
7					
8		32,000			
9					32,000
10			32,000		
11					
12		32,000		28,800	
13					
14					32,000
15		32,000	30,000		

抗血清抗体価 64,000×

第 2 表 対 照 群 抗原稀釈〇

注射後	例 沈澱 素価	血 液		組 織	
		I	II	I	II
第 1 日			25		50
2		25			
3					
4			25	100	100
5		100			
6			100		
7					
8				400	
9					200
10					
11					
12		25±	50	400	
13					100
14					
15			50	200	

抗血清抗体価 64,000×

だ変形していない赤血球を多数に認め一部は組織球により貪喰されている。

第2日

肉眼的所見は大差がないが、伸展標本では瀰漫性の薄い黄褐色色調の部があり、鉄反応陰性で、変形した赤血球を取り入れている単球を処々に、同様赤血球を貪食した形質細胞組織球を多数に認めその胞体には berliner 青反応を呈する顆粒、即ち hemosiderin 顆粒を少数に認む。血塊の周辺に接する黄褐色部には淡黄色、黄色、黄褐色、又は赤褐色等の各種の色調を呈する大小顆粒が出現しはじめる。これら細胞外顆粒は何れも不整形で中には菱形のものもあり殆んど1%塩酸水に10分間浸漬すると顆粒の周囲に青又は緑色の biliverdin と思われる色素が溶出し、顆粒自体も青変又は緑変するし、醋酸亜鉛沃度反応では多く bilipurpurin の螢光を發し、醋酸亜鉛アルコール反応では黄色の螢光を發し鉄反応陽性であるところから細胞外 hemosiderin 顆粒と考えてよいと思われる。

第3日

肉眼的にはなお暗紫青色を呈するが血腫周縁部には黄色調を認める。この部位は組織球が少く、黄色色素は瀰漫性で鉄反応陰性で発煙硝酸の煙にさらすと緑変するので bilirubin と思われる。

第5日

血塊辺縁の瀰漫性の黄色帯中に少数ながら菱形黄色結晶を認め gmelin 反応を行なうと陽性で鉄反応陰性であるところから hemosiderin と考えられる。細胞内顆粒は鉄反応陽性で hemosiderin と思われる。

第6日

血腫はなお赤色の塊状を呈するが周囲は黄色を呈し不定形黄色 hemosiderin 顆粒を含む組織球が点在し周辺の黄色色素中の hematoidin 結晶も漸次増加している。

第7日

血腫の中心部はなお暗紫赤色を呈するが、辺縁は黄褐色乃至橙黄色を示し、鏡検すると細胞外に hematoidin とよく似た黄色顆粒を散見され鉄反応を行うと何れも berliner 青を呈し hemosiderin であることが分る。これら hemosiderin 顆粒はなお細胞内にも認められる。一方細胞外の hematoidin はやや減少の傾向を示すが、細胞内にも一部認められる。

第9日

血腫周辺部にはなお軽度の黄色調をみとめ、そこに細胞内外の hemosiderin 顆粒及びこれに混じて

hematoidin 結晶を多数に認められる。又細胞外の hemosiderin 顆粒に混じて、鉄反応陰性の黄褐色顆粒がごく少数に認められこれらは発煙硝酸で酸化すると徐々に褪色しついに淡黄又は無色に近くなる。又このものを紫外線顕微鏡でみると、黄色の螢光を發し、bilifuscin と思われる。

第14日

血腫の境界が不明確となり、血腫の部に一致して橙黄色調を示す。鏡検すると hematoidin hemosiderin 顆粒が多数認められる。特に組織球の密集部に細胞内性の hematoidin 結晶がかなり多数に認められる。

総括並びに考按

生体内に於て血色素より胆汁色素の生成される化学的過程は H. Fischer, R. Lemberg, 上代, 山岡ら多数の諸家により糾明された試験管内模型実験における過程と同一であることは多数の当教室の業績で明かになりつつある。教室難波, 西信は生体皮下組織内における血色素の分解を組織化学的に追及し、血色素 heme は choleglobin, biliverdin, bilirhodin, biliverdin, bilirubin, 鉄錯塩をへて biliverdin, bilirubin, 一部は更に bilifuscin 様物質にまで変化することを明かにした。著者も難波, 西信らと同様方法で家兎大腿皮下組織内に牛血液を注入して血色素 heme の変化を追及したが、大体次のような過程をたどるものと考えられる。

組織球外では24時間後の瀰漫性半流動性液状物は2日目には淡黄褐色色素となり、徐々に hemosiderin 顆粒へと移行し、3日目には bilirubin 色素を、5日目には hematoidin 結晶を認め、9日目には hemosiderin 顆粒に混つて bilifuscin を少数認め、14日に至りその数が増加した。

組織球内の過程を見ると貪食された赤血球より、2日目には鉄反応陽性の黄色色素を生じ、5日目頃には一部は顆粒状となり、7日目には hematoidin 結晶を認め14日目にはその結晶を多数認めた。

以上の成績は難波, 西信の成績と一致しており haemosiderin 顆粒は難波, 西信らの明かにしたように choleglobin, 或は bilirhodin-, biliverdin-, bilirubin-鉄錯塩であることが認められ hemoglobin より bilirubin への分解過程に生ずる中間産物と考えられる。又 hematoidin は H. Fischer らの明かにした通り bilirubin に一致するものである。

次に血色素 globin の消長を heme の観察を行つ

たと同一の組織について観察すると、注入第2日目より最高値を示し、第15日までの観察では常に最高値を維持した。第1日目に於てなお最高値に達しないのは注入血液が赤血球のままであつて直ちに溶血が起り難く血色素としての遊離が不十分なためと思われる。今血色素 heme より choleglobin の生成される過程において試験管内実験で明らかにされた如く血色素 globin の変性が起るとすれば当然 globin 値の消長に変動がみられるはずである。然しながらその変性は試験管内模型実験たる血色素-l. ascorbin 酸-分子酸素-系の反応において教室人見、正岡らが証明したような非可逆反応でなくて上代教授により提唱された Perturbation 程度の可逆的変性に過ぎないものであるとすれば教室山本(裕)が血清学的に沈降反応により証明した通り沈降反応の上で示す変化は僅かであり、又注入された赤血球中より遊離する血色素もまた同時に同一過程の変化を受けることは考えられないから、血清学的に globin の変動はみられないはずであらう。従つて生体内に於て血色素より胆汁色素の生成される過程に起る globin の変化は上代らの唱える軽微な可逆的变化に過ぎないものと思われる。

次に血液を注入した皮下組織での血色素より bilirubin 更には bilifuscin への分解過程と globin の消長との関係を比較してみると、注入血液は軽時的に減少し、第9日頃よりその減少は著しく、第14日では境界不鮮明となり、それと共に組織球外では hemosiderin, hematoidin 形成は速かた、第7日では既に hematoidin は減少を始め、第9日では bilifuscin を認め、第14日ではむしろ組織球内の変化が主であつた。而して組織球内の変化は組織球外のそれより可成りおくれ第14日では hematoidin の形成が最も明瞭に認められた。処で hemosiderin は先にのべた如く choleglobin 乃至 bilirhodin, biliverdin, bilirubin の鉄錯塩と考えられ、globin の結合していると考えられているが、globin の側より総量を求めると血液注入直後の globin 量に比べれば血色素及びその分解物の量より推して可成り減少している如く考えられるが、事實はこれに相違して減少していない。するとこの凡ての globin は分解物質に結合したままでなくて既に globin はこれらより分離し吸収が蛋白質であるため緩慢で最後まで組織中に止つたものとする。ところで生体内において血色素より生じた直後の bilirubin は間接 bilirubin の性状を示すがその化学的性状について

は C. J. Watson の唱えた bilirubin-globin 説がなお一般に信じられている。彼の説の根拠をなすものは N. Fiessinger, A. Gajdos & M. Polonowski 等の研究成績で彼等によれば血清 albumin は bilirubin 曹達塩の純水溶液を加えると直接反応を呈するが globin と結合させると間接反応を呈すること、又間接 bilirubin を含む血清から chloroform で bilirubin を抽出した後へ hematin を加えると特有な methemoglobin の吸収像がえられるという。これらの実験結果そのものの当否は別として上記の著者の事実からすれば血色素より組織内で生じた bilirubin には globin はもはや結合していないと考えた方が妥当ではあるまいか。換言すれば教室正岡、長島らの別の実験によりえられた如く間接 bilirubin は bilirubin-globin でないという事実を生体内の生成過程から裏付けしたこととならう。

結 論

家兔の大腿内側皮下組織中に牛血液を注入して組織化学的に血色素 heme の分解過程を追及する一方血清学的に血色素 globin の消長を追及し次の結果を得た。

1. 皮下に牛血液を注入すると組織球外では比較的速かに分解が行われ注入後第2日に細胞外 hemosiderin, 第3日では bilirubin を、第5日には hematoidin 結晶の生成を認め、第9日には bilifuscin の生成を認め、14日にはその数を増した。一方組織球内では第5日には hemosiderin 顆粒を、7日には hematoidin 結晶を、14日には hematoidin 結晶が増加した。
2. 組織中血色素 globin の沈降素価は第1日やや低いが、第2日以後第15日までの経過観察では 32,000倍を示し常に最高値を維持した。
3. 従つて血色素の分解時にみられる globin 変性はごく軽微な可逆的なもので上代らの説は妥当と思われる。
4. 血色素より hemosiderin 次で hematoidin (bilirubin) 或は bilifuscin が生成され血腫は殆んど消失した時期においても組織中の globin の抗原価は不変であるところから globin は血色素より bilirubin の形成される中途において分解し組織内に長く留つたものと解され、間接 bilirubin の bilirubin-globin 説は妥当とは思われない。

主 要 文 献

- 1) H. Fischer & F. Reindel : Z. physiol. chem. **127**, 299, (1923)
- 2) A. R. Rich & J. H. Bumstead : Physiol. Rev. **5**, 182, (1925)
- 3) 林 : 日本体質学雑誌, 16巻1. 2号合併号, (昭26)
- 4) 難波 : 日本内科学会誌, 40巻7号, 401, (昭27)
- 5) 西信 : 医学研究, 25巻7号, 1273, (昭30)
- 6) R. Lemderg : Perspectives in Biochemistry, Cambridge University Press 137, (1937)
- 7) G. Barkan & O. Schales : Z. physiol. chem. **248**, 96, (1937)
- 8) 上代 : 生化学, **26**, 177, (1954)
- 9) R. Duesberg : Arch. f. exper. Path. u Pharm. **174**, 305, (1934)
- 10) K. O. Pedersen & J. Waldenström : Z. physiol. chem. **245**, 152, (1937)
- 11) N. Fiessinger, A. Gajdos & M. Polonowski : C. r. Soc. biol. **135**, 1572, (1941)
- 12) Idem : C. r. Soc. biol. **136**, 714, (1942)
- 13) 正岡 : 医学研究, **23**巻9号, 1709, (昭28)
- 14) 長島 : 医学研究, **24**巻9号, 1862, (昭29)
- 15) 上野 : ミオグロビンの生理と病理, その血清学的研究. 日本医書出版株式会社.
- 16) H. Fischer & H. Orth : Die Chemie des Pyrrols, Bd II, I (1937) Akademische Verlags ges. Leipzig.
- 17) R. Lemberg : Hematin Compounds and Bile Pigments, Interscience, New York. (1949)
- 18) 山岡 : 日本内科学会誌, **42**巻8号, 41, (昭28)
- 19) 山本 (裕) : 医学研究, **26**巻9号, 2464, (昭31)

Studies on the Process of Hemoglobin Decomposition in the Subcutaneous Tissue of Rabbit

Part 1. Changes in the heme and the globin after the injection of bovine blood into the subcutaneous tissue of rabbit

by

Masao Yamamoto

1st Department of Internal Medicine Okayama University Medical School
(Director : Prof. Kiyowo Kosaka)

By injecting bovine blood into the subcutaneous tissue on the inner side of the rabbit femur the author studied histochemically the Decomposition of hemoglobin-heme as well as pursued serologically changes of hemoglobin-globin; and obtained the following results.

1. When bovine blood is injected subcutaneously, the hemoglobin decomposition takes place relatively quickly outside the histiocytes. Namely, on the second day after the injection the formation of hemosiderin, on the third day of bilirubin, and on the fifth day of hematoidin crystals, on the ninth day of bilifuscin can be recognized outside the cells; and the number of these is increased on the 14th day. On the other hand, within histiocytes are formed hemosiderin granules on the fifth day, hematoidin crystals on the seventh day, and hematoidin crystals are increased in number on the 14th day.

2. The precipitation of globin in the tissue is somewhat slow on the first day of the injection, but from the second day to the 15th day the precipitation presents the value of 32,000-fold, and this maximum has been maintained throughout the period observation.

3. Therefore, the degeneration of globin observable at the process of the hemoglobin

destruction is extremely trivial yet persistent, and this fact corroborates the theory advocated by K. Kajiro et al.

4. From the fact that hemosiderin is formed from hemoglobin, and then the hematoidin (bilirubin) or billifuscin is formed and that the antigenic value of globin in the tissue is unchanged even at the stage when hematoma has almost completely disappeared, it is believed that globin is decomposed in the course of bilirubin formation from hemoglobin and is kept in the tissue for a long period of time. Therefore, the theory that indirect bilirubin is bilirubin-globin seems to be not appropriate.
