

放射性鉄による試験管内胆汁色素 生成中間産物に関する研究

第 1 編

Pyridine-hematin より胆汁色素生成中間産物の Chromatography による検討

岡山大学医学部第一内科教室 (主任: 小坂教授)

吉 川 浩 二

[昭和 34 年 8 月 7 日受稿]

1930年 O. Warburg & E. Negelein¹⁾ が血色素より調製した hemin を pyridine 水に溶解し, cystein, glycerinaldehyde, hydrazin 等の還元剤を加え, 分子酸素を作用させて, 鉄を含む色素を得, “grünes Haemin” と命名して以来, 試験管内での血色素より胆汁色素生成過程の研究がその緒についた. その後 R. Lemberg²⁾³⁾ はこのものが, Biliverdin-dimethylester と第二塩化鉄及び塩酸の各一分子より成ることを明らかにして, C₃₅H₃₆O₆N₄ · HCl · FeCl₃ の分子式を与えた. 爾来 H. Fischer & H. Libowitzky⁴⁾, G. Barkan⁵⁾ 等により hemin に代る血色素と l-ascorbin 酸及び分子酸素を用いて胆汁色素生成過程が追求され, 本邦でも日本医大生化学上代教室⁶⁾⁷⁾ 及び著者等の教室に於いて研究が進められている.

血色素の胆汁色素への分解中間産物は, choleglobin, verdohemoglobin (R. Lemberg)⁸⁾, pseudohe-moglobin (G. Barkan)⁵⁾ 等の名称で呼ばれているが, これ等のものは biliverdin の三価鉄錯塩に変性 globin の結合したものを中心とする物質群の総合的名称と考えられている. 1925年 G. Barkan⁵⁾ は, 溶血に 0.4% の割に塩酸を加えて遊離する ion 状の鉄のあることを認め, これを “leicht abspaltbares Bluteisen” 易分離鉄と呼称し, これが血色素より胆汁色素への分解中間産物に由来すると述べ, R. Lemberg³⁾ の支持を得たが反対する人もある. 若しこの微量の鉄を測定し得れば, choleglobin 及びその類似物質の消長を知る上に, 甚だ有意義といわねばならない.

これ等の関係を明らかにするために, 教室湯浅⁹⁾, 寺尾¹⁰⁾, 柏管¹¹⁾, 間賀¹²⁾ 等は, この中間産物の時

間的消長を, 試験管内で易分離鉄を中心とする鉄の消長面より追求し, column chromatography による化学的検索と相まつて, その性状を明らかにし得たのであるが, Rhodankali, α - α' Dypyridyl 及び o-phenanthroline 法により Pulflich 光度計を用いて比色定量を行つたために, 湯浅⁹⁾ も指摘した如く, 鉄定量時に溶液の pH 及び対照液の考慮を要するために, 可成りの誤差は不可避であつた. そこでこれ等の欠点を償うため著者は放射性同位元素 Fe⁵⁵ を追跡子として使用し, この過程に検討を加えることにした.

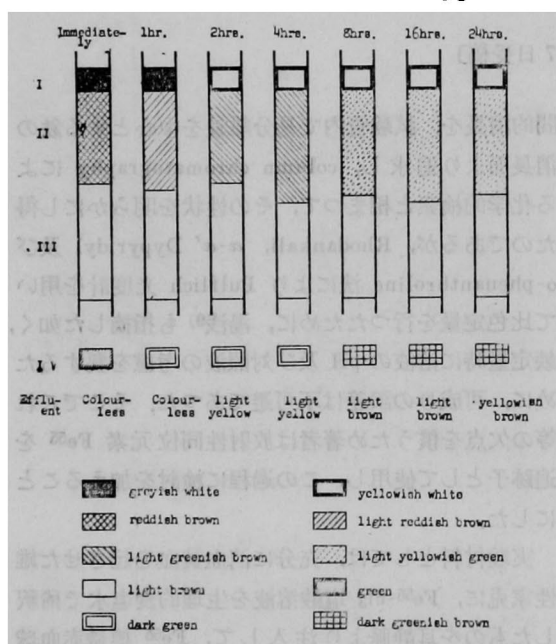
実験材料としては, 十分に滴血貧血を起させた雄性家兎に, Fe⁵⁵-cl₃ 塩酸溶液を生理的食塩水で稀釈したものを耳静脈より注入して, Fe⁵⁵ 標識赤血球を得, これより放射性 hemin を調整した.

反応液としては, 20% pyridine 溶液 20 cc に Fe⁵⁵ 標識 hemin 結晶 5 mg を溶解して l-ascorbin 酸 100 mg を作用させ, 酸素非通気, 38° C 恒温槽に放置し, 反応直後, 1, 2, 4, 8, 16 及び 24 時間に反応液の各 5 cc を採り, その各々につき column chromatography を行つた. chromatograph 吸着剤としては, Brockmann 製活性 alumina を使用し, 使用前 alumina 中に放射能の無いことを確認して用いた. 吸着柱は後述の通り 10 cm とし, 展開剤としては, 水, ether, chloroform, methanol, pH 7.1 M/15 Soerensen 磷酸塩緩衝液等を使用した. 然しながら第 4 層の緑色乃至暗緑褐色層は展開が大きくて, 吸着柱の長さ及び展開剤の量の幾組かの組合せにより, 吸着柱内に止めようとしたが, 或いは展開不十分となり, 或いは展

間に長時間を要して反応の時間的ずれを生ずるために、この意図を断念して第4層を流下液として採取する事にした。この意味で吸着柱の長さ、展開剤の量及び展開時間等を再検討し、吸着柱 10 cm, 展開剤量 10 cc を決定し、この条件で第4層が完全に流下液中に含有されることを確めた。

かくして作製した反応時間毎の column chromatogram は、第1図に示す如くであつた。即ち反応直

Fig. 1. Comparative Diagram of Hourly Chromatograms and Effluent of the Resulting Solution of Pyrine-hematin under Influences of 1-Ascorbic Acid and absence of oxygen.



後上端より灰白、赤褐、淡褐及び緑色層の4層を認め、終始分割層は4層であつた。第1層の灰白色層は、2時間目以後黄白色に変じ、第2層の赤褐色層は反応1時間目で赤色調を減じて淡赤褐色層となり、反応2時間目には淡緑褐色、更に反応8時間目以後は淡黄緑色層となり、反応時間毎に吸着層の中をやや増減した。第3層の淡褐色層は終始この色に留つたが次第に色調を減じた。流下層である第4層は、経時的に次第に緑色調を増し、反応8時間目以後は褐色調を混じて暗緑褐色を示した。第4層流出前に吸着柱には着色層として認められずに流出する少量の着色滲透液を認め、これを滲透液として採取した。滲透液は反応直後及び1時間目には無色であつたが、反応2時間目には淡黄色となり、経時的に褐色調を増す傾向が認められた。

そこでこれ等の反応液に就て、G. Barkan の易分

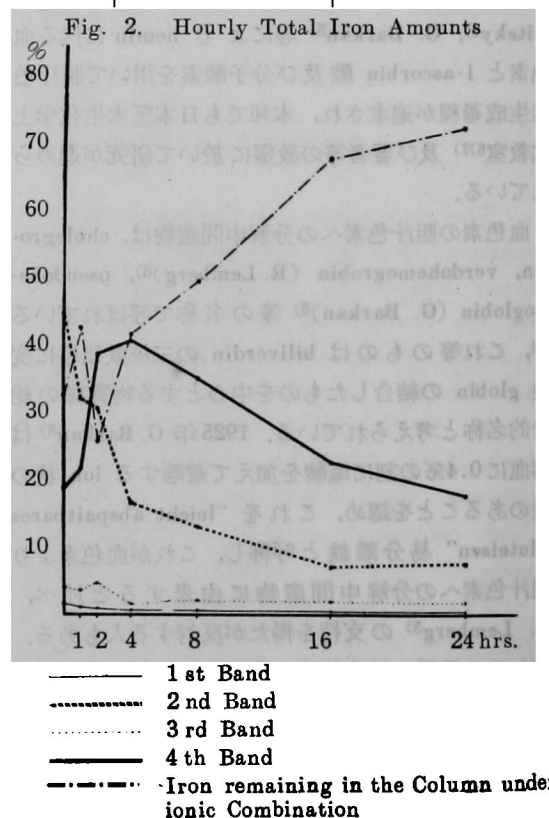
離鉄の立場から酸による鉄遊離の難易を検討しようとし以下の実験を試みた。この場合鉄遊離が必ずしも塩酸を必要とせず、他の有機、無機酸でも起ることが知られており、除蛋白に用いる三塩化醋酸による鉄遊離も考えられ、教室湯浅はこれを肯定し、G. Barkan⁵⁾ 及び R. Lemberg³⁾ は否定した。

扱て後述する如く、放射能測定にあたり、Fe⁵⁵ の特性上湿性灰化を要するのであるが、alumina の吸着層をそのまま湿性灰化することは不能のため、やむなく各吸着層の水溶液液につき鉄量を検討することにした。即ち各吸着層を分割分離し、30 cc の蒸留水を加えてよく攪拌し、遠沈分離した上清につき、総鉄量、0.4% に塩酸添加直後鉄量、塩酸に代え蒸留水を用いた所謂遊離鉄量及び易分離鉄量を測定した。

総鉄量は第1表、第2図に示す如く、第1層に最

Tab. 1. Experimental Error (1)

Sample	Counts	Deviation (%)
1	88098	- 0.4
2	89933	1.6
3	88114	- 0.4
4	87971	- 0.6
Mean	88529	



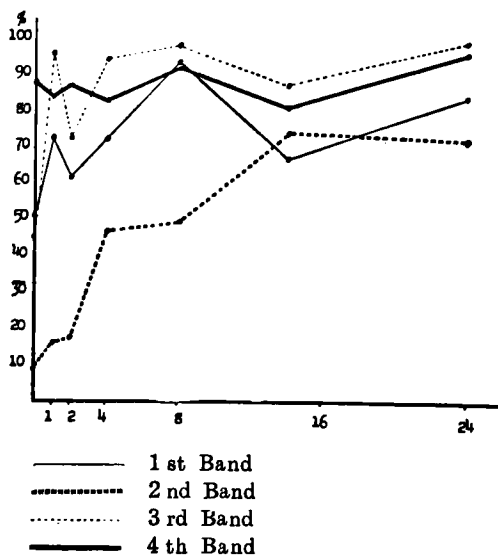
も少く、次いで第3層であり、何れも痕跡程度に留り、経時的変動に乏しかった。第2層に於いては、経時的に減少の一途を辿り、反応16時間で最低値に達した。これに反して第4層では、4時間目まで急速に増量し、これを頂点として以後ゆるやかな曲線を描きつつ減少した。この場合使用 hemin の count と測定上の総 count との差、即ち蒸溜水で溶解せずに吸着柱内にイオン結合のまま留った鉄量を計算上求めてみると、反応2時間目に一過性に減少をみた以外は常に増量し、反応24時間目には72%に達した。後述する Fe⁵⁵ 測定上の特性より、何れの層に如何程の残存鉄があつたか不明ではあるが、興味ある事実である。なお滲透液につき総鉄量を求めてみると、経時的に増量する傾向が認められた。

水溶性液に0.4%の割に塩酸を加え、38°C恒温槽に16時間放置した後の所謂易分離鉄量を測定し、総鉄量に対する百分率で表わすと、第2表、第3図に示す如く、第2層が経時的に増量して反応16時間でほぼ定値に達するに対し、第4層に於ては、反応直後より第2層のその約10倍も達する高値を示し、

Tab. 2. Experimental Error (2)

Sample	Not Extracted By Ether	Extracted By Ether
1	19726	15875
2	19383	15995
3	19515	15235
4	—	16139
Mean	19541	15811

Fig. 3. Amounts of Easily Split Off Iron



時間的変動に乏しかった。なお第2層は反応16時間より第4層のそれに接近するが、凌駕するには至らない。第1、第3層に於ても、就中特に後者に於ては、第4層に似て可成りの高値を示すのであるが、時間間変動が著しい。これは総鉄量が僅少なために、測定誤差が可成り大きい事を考慮する必要があるものと思われる。

易分離鉄と、0.4%に塩酸添加直後鉄量及び所謂遊離鉄量を比較検討すると、第4、5、6、7図に示す如く、三者間にほぼ並行関係を認めるが、常に易分離鉄量が優位を保持した。後二者間には一定の傾

Fig. 4. On the 1st Band, Relation with Three Sorts of Iron and Biliverdin

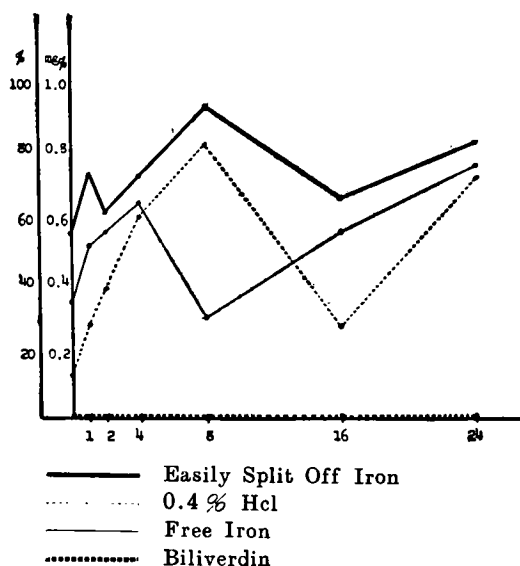


Fig. 5. On the 2nd Band, Relation with Three Sorts of Iron and Biliverdin

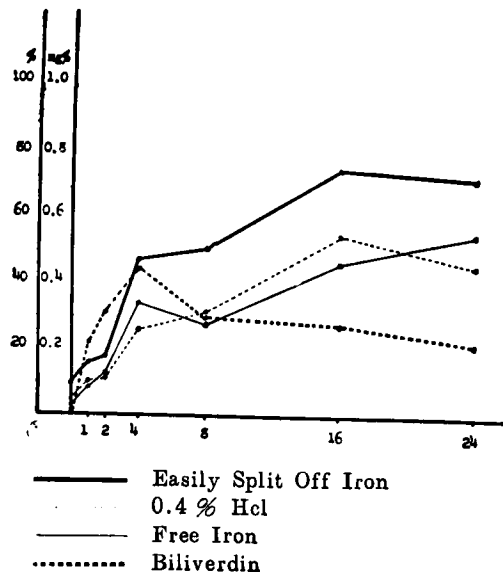


Fig. 6. On the 3rd Band, Relation with Three Sorts of Iron and Biliverdin,

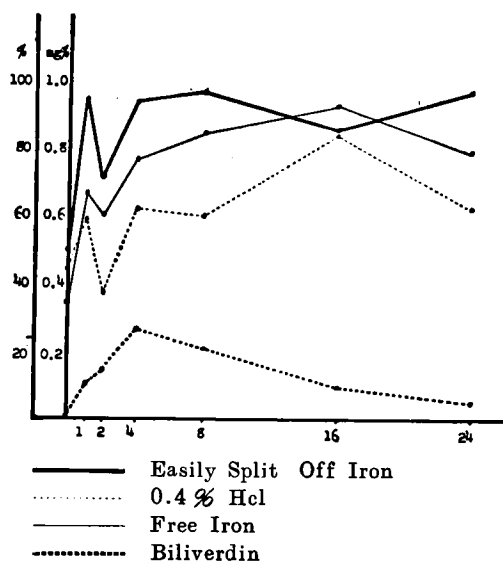
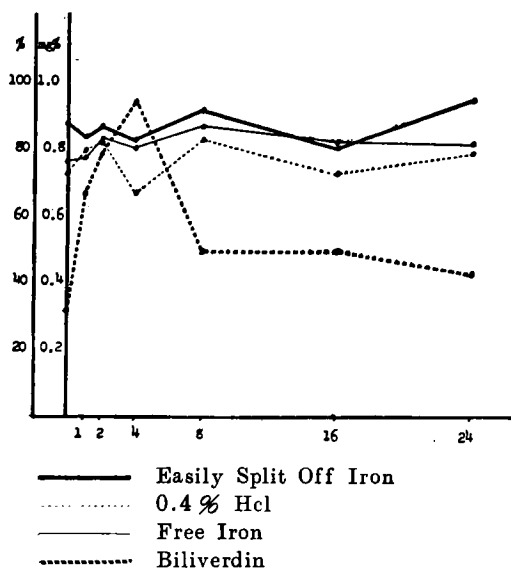


Fig. 7. On the 4th Band, Relation with Three Sorts of Iron and Biliverdin.



向が認められなかつたが、本実験はあくまで column chromatography で分割しえたものの水溶解液について行つたものであるから、前述の水で溶解せずに吸着柱内にイオン結合のまま留つたと思われる鉄と共に、多くの問題を残すにしても、0.4%に塩酸添加直後鉄量と遊離鉄量との間に一定の関係を認めず、ある場合には寧ろ遊離鉄が優位を示すことは、測定誤差を考慮しても有意の所見と思われる。

次に M. Engel¹³⁾ 及び教室永井¹⁴⁾ の方法に従い、各時間吸着層を分割分離し、33%醋酸 15 cc で溶解し、これに醋酸曹連 3 g を完全に溶解させ、ether

で抽出し、分離した ether を蒸留水でよく洗滌した後、10%塩酸と共に振盪してえた biliverdin を測定した結果は、第5表、第4, 5, 6, 7 図に示す如くなつた。即ち第1層には殆んどこれを認めなかつたが、他の各層に於ては総て5時間目を山とする曲線がえられた。而して第4層に最も多く、次いで第2層、第3層の順となつた。

以上よりして、第1層は総鉄量が少く、易分離鉄は認めるが、biliverdin を抽出しえなかつた事から推察すれば、血色素分解が既に進行したものか、又は verdohemochrome を経ぬ分解産物であるか不明である。第2層に於ては、反応初期の酸に対する鉄遊離の困難な物質より、経時的に鉄遊離の容易な物質への変化過程が窺いえられるに対し、第3, 第4層に於ては、反応初期よりすでに鉄遊離の容易な物質のみよりなつていることが分る。

以上3層に於ては、経時的消長は異なるにしても、総て易分離鉄を含有し、鉄遊離後の protoporphyrin 分解産物は biliverdin であるといひうる。而して易分離鉄の消長と biliverdin 収量との間には、並行関係が認められなかつた。

更に各分割層につき吸収曲線を求めた。即ち各時間吸着層を分割分離し、蒸留水を加えて溶解した液につき Beckman の Recording spectrophotometer Model D. K. を使用して吸収曲線を追求した結果、第1, 第3層には特別の吸収極大を認めえなかつた。而して第2, 第4層に於ては、第8, 第9図に示す如き曲線がえられた。

第2層に於ては、反応直後 610 m μ に吸収極大を認め、反応1時間目にはこの極大はやや平坦化し、反応2時間目以後消失した。この反応直後及び1時間目の溶解液を、sodium dithionite 及び苛性曹連で還元変性すると、557 m μ 及び 525 m μ の2つの吸収極大が認められた。従つて第2層には、R. Lemberg³⁾ や菊地¹⁵⁾ が指摘し、更に教室間賀¹²⁾ が pyridine hematin より胆汁色素生成中間産物検索の際に、Silicagel を吸着剤とした chromatography で反応直後にのみ認め、赤褐色層と淡赤褐色層と同一物質と考えられ、pyridine hemochromogen 乃至 pyridine hemichromogen の吸着したものである。

第4層溶解液の吸収曲線は、反応直後 660, 530, 500 m μ の3つの吸収極大を認めた。反応1時間目には、660 m μ の極大はやや短波長側に移動して 656 m μ となり、終始この極大が認められた。反応

Fig. 8. Absorptious Curve of the 2nd Band

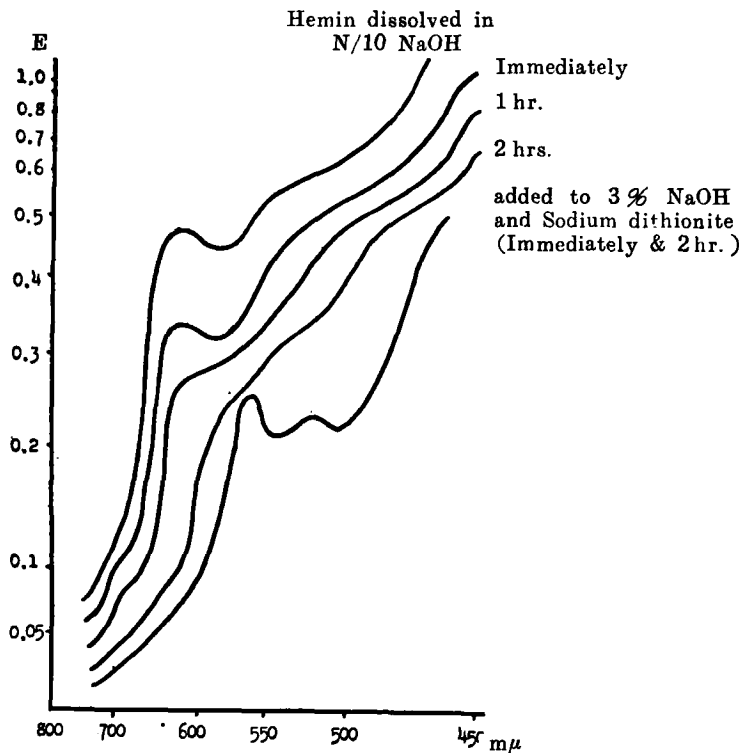
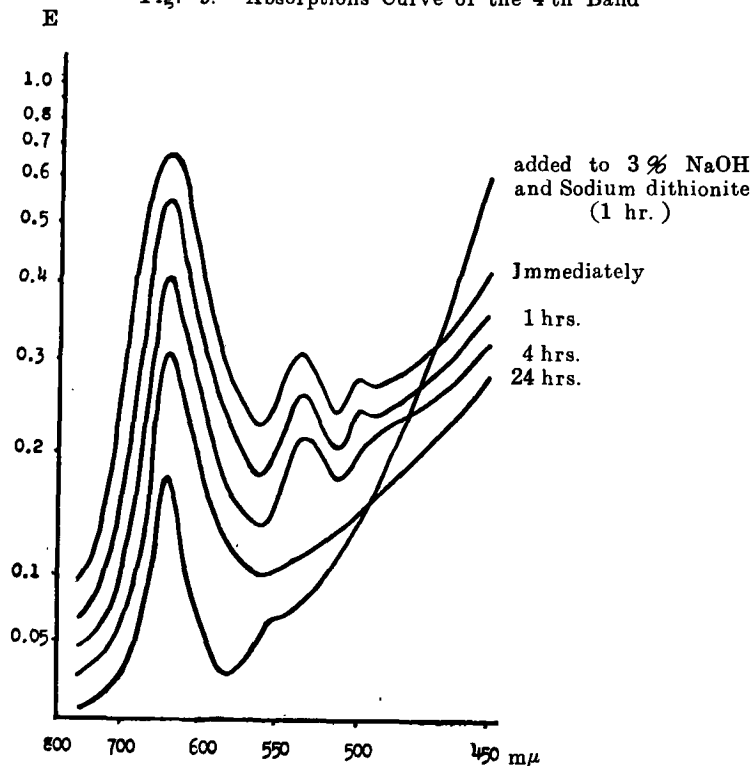


Fig. 9. Absorptions Curve of the 4th Band



4時間目には 500 $m\mu$, 反応24時間目には 530 $m\mu$ の極大が夫々消失し, 656 $m\mu$ の極大のみが残った。即ち第4層に於ては, R. Lemberg³⁾ の指摘した 657, 530, 498 $m\mu$ の protoverdohemochrome の吸

収曲線とほぼ一致し, 反応時間の経過と共に, pyridine verdohemochrome の 656 $m\mu$ の単一吸収極大となり, 反応の進行状態を捕捉しえたものと考えられる。なお反応1時間目を取り, sodium dithionite 及び苛性曹達で還元変性させると, 650 及び 554 $m\mu$ がえられた。

滲透液につき吸収曲線を求めたが, 何の特記する吸収極大を認めず, sodium dithionite 及び苛性曹達による還元変性に於ても変化は認められなかつた。

以上全層を通じて R. Lemberg²⁾ のいう 639 $m\mu$ 物質, 菊地¹⁵⁾ のいう 630 $m\mu$ 物質は遂に認めえなかつた。これは column chromatography を行うに当り, 展開操作等に時間を要し, 又吸着柱の分割分離に際して空中酸素の作用等も考慮されるので, 見出しえなかつたものと思われる。biliverdin 収量最高に達する反応4時間目の第4層より, M. Engel 及び永井の方法に倣い, 10%塩酸層に抽出された青色溶液の吸収曲線を求めてみると, 655 $m\mu$ に吸収極大を有する曲線がえられた。この塩酸抽出液に, sodium dithionite の一刀尖を加えて還元すると, 青色より黄色に変じ, gmelin 反応, alcohol を加えた後の diazo 反応陽性で, aldehyde 反応及び schlesinger 反応は陰性であつた。従つてこの黄色々素は bilirubin で, 還元前の青色々素は biliverdin である。

以上により pyridine-hematin より胆汁色素への分解中間産物は, 鉄と protoporphyrin の分解産物との錯酸に, pyridine が配位していることは確実であるが, column chromatography による配位や色調の相

異, 酸に対する鉄遊離の態度及び吸収曲線の相異等から推論すれば, 種々の段階のものが含有されていることがわかる。

実験の部

1. 実験材料

1.1. 放射性鉄

放射鉄は、米国 Oak Ridge National Laboratory より輸入された $\text{Fe}^{56}\text{Cl}_3$ の塩酸溶液を使用した。 Fe^{56} は半減期 2.9 年で、崩壊して安定な同位元素 Mn^{56} になり、その際 K 電子捕獲で 5.9 KV の弱い X 線のみを放射する。

1.2. 放射性鉄の精製

追跡子として使用する前に、製造過程に混在する微量の放射性コバルトを、Vosburgh 等¹⁶⁾ の方法に従い除去した。即ち原液に適量の濃硝酸を加えて蒸発乾固し、これを 20 cc の 8N 塩酸に溶解して分液漏斗にとり、ほぼ同量の isopropyl ether と共に充分振盪して、完全に鉄を ether 層に移行させ、次で 0.1 N 塩酸 20 cc を加えて再び振盪し、鉄のみを塩酸層に移行させた。

1.3. 材料家兎の調製

体重 2.0~2.5 kg の雄性家兎を選び、心穿刺により体重毎 kg 15 cc の血液を 3 日間隔で数回採取し、充分貧血を起させた後、鉄量として体重毎 kg 0.05 mg の $\text{Fe}^{56}\text{Cl}_3$ を 1 回注射量として、これを予め 20 cc の生理的食塩水で希釈して、頻回に互り耳静脈より注射し、1 週後心穿刺により採血し、 Fe^{56} 標識家兎血球浮游液をえた。

1.4. 放射性 hemin の調製

Fe^{56} 標識血球浮游液より、菊地¹⁷⁾ の方法に倣い調製した。

1.5. hemin の放射能に関する検討

hemin の specific activity は高いほど実験に都合であり、又実験誤差も少いのであるから、特にこの点に留意した。本実験に使用した hemin 結晶 1 mg は、平均 42,428 counts/10 min. であった。

2. 反応液の調製

上述の方法で調製した Fe^{56} 標識 hemin 結晶 5 mg を N/10 苛性曹門 1.0 cc に溶解したもの、pyridine 4.0 cc を pH 7.1 M/15 Soerensen 磷酸塩緩衝液 9.5 cc に加えたもの及び結晶 l-ascorbin 酸 100 mg を蒸溜水 1.0 cc に溶解し、N/10 苛性曹達 4.5 cc で中和したものを混じり、全量 20 cc の反応液を作り、これに流動 paraffin を重積して容器を 38°C 恒温槽に非通気のまま放置し、反応開始直後、1, 2, 4, 8, 16, 24 時間後に於て、各時間毎に反応液から重積した流動 paraffin を除いて被検反応液と

した。

3. chromatograph 吸着柱の作製法

教室湯浅⁹⁾、寺尾¹⁹⁾ の方法に倣い、内径 1.0 cm、長さ 25 cm の円柱硝子管の一端に脱脂綿球を詰め、その上に吸着剤として Brockmann 製活性 alumina を一様の固さになるように、少量宛充填し吸着柱の高さを 10 cm とした。吸着柱の高さに関しては、5, 10, 15, 20 cm の 4 者につき検討したが、後述第 4 層は展開が大で、如何にしても吸着柱内に止めえず、又展開に長時間を要し反応の時間的ずれを生ずる事から、5 cm では展開に不充分であり、15, 20 cm では長すぎるため、10 cm として充分量の展開剤を使用し、第 4 層を流下液として採取する事にした。斯くして作製した吸着柱に、先づ蒸溜水を流して全体が湿り、かつ気泡を駆逐した後、反応液 5.0 cc を注入して自然落下のまま放置し、反応液が全部濾過されると直ちに 7.1 M/15 Soerensen 磷酸塩緩衝液 10 cc を展開剤として注ぎ chromatogram を作製した。

4. 測定方法

4.1. biliverdin の定量法

M. Engel¹³⁾ 及び永井¹⁴⁾ の方法によつた。

4.2. 吸収曲線描写法

Beckman の Recording Spectrophotometer Model D. K. によつた。

4.3. 鉄量定量法

o-phenanthroline 法により、教室木戸¹⁸⁾ の方法に準じた。

4.4. 易分離鉄定量法

G. Barkan 及び Walker¹⁹⁾ の方法に準じた。

4.5. Fe^{56} 定量法

Peacock²⁰⁾ 並びに Vosburg¹⁶⁾ に準じて以下の如く行つた。

4.5.1. 湿性灰化法

試料を Kjeldahl flask に採り、これに carrier して 2 mg の非放射性塩化第 2 鉄を加えた後、濃硫酸 3.0 cc と濃硝酸 1.0 cc と共に弱く加熱して水を駆逐した後、強熱を加えて酸が白煙を出しはじめた時、60% 過塩素酸を 5 滴づつ数回加えて強熱のまま 3~5 時間加熱すると、内容は淡黄色透明となり灰化を完了した。

4.5.2. 電気鍍金法

上述の如く Fe^{56} は、弱い X 線のみを放射するので、測定上自己吸収を防止するために、銅板上に電気鍍金を行い測定する。鍍金には、神戸工業製電気

鍍金槽を使用し、銅板は予め灼熱して無水メタノール中に投入する操作を2~3回行つて、完全に銹を去つたものを使用した。

上述 Kjeldahl flask 中の灰化液を、容量 100 cc の遠心沈澱管に 0.1N 硫酸で洗い移した後、なお管壁に残る 6N 塩酸を加え加熱して黄色を呈さなくなるまで洗い、完全に flask 中の鉄を移しとつて全量を正確に 25 cc となし、その 0.1 cc を採り o-phenanthroline 法で鉄量を測定して、総鉄量が 5 mg になるように更に carrier を加えた。次いで攪拌しながら 28% ammonia 水で中和して、褐色の水酸化第 2 鉄の雲架状沈澱を作り、遠心分離して上清を棄却した後、褐色沈澱に 6N 塩酸 3.0 cc を加えて溶解した。然る後分液漏斗に溶液を移し、なお管壁に残る鉄を 10 cc の ether で 2 回洗つて分液漏斗に加え、充分振盪して完全に鉄を ether 層に移行させた。この ether 層に 25 cc の飽和蔞酸アンモニウムを加えて振盪し、再び鉄をこの層に移行させた後、分液漏斗から ether 層を除いて電気鍍金槽に移して、selenium rectifier を用い 8 Volt, 200 mA, 4 時間通電し銅板上に鉄を鍍金した。教室川口²¹⁾によれば、鍍金残液について鉄量を比色定量した結果、98%以上の鍍金完了通電時間は 4 時間で充分である。

4.5.3. 実験誤差に関する検討

Geiger-Müller 計数管での測定に際し、count 数と実験誤差との関係は、先に教室川口²¹⁾が報告したところであるが、前述の如く Fe⁵⁵ 測定上の特性より、湿性灰化、電気鍍金等の複雑な操作を反復するために、実験操作上に可成りの誤差が出るのではないかという危懼がある。この問題を検討する意味で以下の如く予備実験を実施した。

放射性 hemin 結晶 20 mg を N/10 苛性曹達 5 cc に溶解し、その各 1 cc を別々の 4 つの Kjeldahl flask にとり、湿性灰化電気鍍金を行い Geiger-Müller 計数管で測定した結果は、第 1 表に示す如くであった。即ち誤差は 2.0 % 以下となり実験遂行上充分であることがわかつた。

以上予備実験のもとに、教室川口²¹⁾の方法に倣い電気鍍金を行つた。即ち前述の電気鍍金法で、水酸化第 2 鉄の雲架状沈澱を作るまでは同様操作を行つた後、この沈澱を 3M 硫酸 5 cc に溶解したものを今一度 28% ammonia で中和し、褐色雲架状沈澱を遠心分離し上清を棄却して 3M 硫酸 0.5 cc に溶解し、飽和蔞酸溶液 1 と飽和蔞酸 ammonium 溶液

5 との混液 20 cc と共に電気鍍金を行つた。しかし実験途上誤差が大となり、鍍金残液に黄色着色を認め、明らかにその操作上に欠陥のあることがわかつた。そこでこの原因を追求した結果、この実験に蔞酸塩緩衝液を使用したために蔞過剰となり、上述の方法では鍍金不能なることがわかり、Vosburg¹⁶⁾の方法に準じて同一操作上に ether 抽出を加えることにした。

そこでこの両操作間の鉄の損失量を検討する意味で次の実験を試みた。即ち放射性結晶 hemin 40 mg をとり、N/10 苛性曹達 10 cc に溶解し、その各 1 cc を別々の Kjeldahl flask にとり、湿性灰化し、その半数に ether 抽出を行い、残り半数にこれを行わず比較した結果は第 2 表に示す如くなつた。

これより鉄損失量を求めてみると 19% であつた。

3.5.4. 放射能測定法

以上の如くしてえられた鍍金標本を乾燥器に入れて保存し、一連の実験は放射能の減衰を考慮して同一日に測定を行つた。測定には神戸工業製 Geiger-Müller 計数管 132 型を使用し、測定距離 7 mm, 計数時間は 10 分とした。

5. 反応液の chromatography と時間毎の chromatogram

上述反応液 5.0 cc を採り、column に注入して自然に滲透させ、全部滲透を経ると直ちに展開剤として 7.1 M/15 Soerensen 蔞酸塩緩衝液を 10.0 cc 注入し、chromatogram を作製した。前述の如く第 4 層は展開が大で流下層として採取したが、なお反応 2 時間目以後に於て、流下層の出現以前に黄色乃至黄褐色の滲透液をえた。

反応各時間毎の chromatogram は第 1 図に示す如くであつた。即ち 4 層に分割し、反応各時間毎に吸着層の色及び配分を異にした。

6. 各吸着層に関する検討

6.1. 鉄量よりみた各吸着層の検討

各吸着層を分割分離し、夫々 30 cc の蒸留水を加え、ガラス棒でよく攪拌して溶出を行い、遠心分離した上清につき、以下の方法に従い鉄量を測定し検討を加えた。

a) 総鉄量よりの検討

上述の方法により溶離した液の 5.0 cc を採り、Kjeldahl flask で湿性灰化し電気鍍金を行い、Geiger-Müller 計数管で測定した結果は、第 3 表、第 2 図の如くであつた。計測値は使用した放射性

Tab. 3. Total Iron Amounts. C: Counts.

	immediately		1 hr.		2 hrs.		4 hrs.		8 hrs.		16 hrs.		24 hrs.	
	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%
I	720	1.3	480	0.9	420	0.7	150	0.2	258	0.4	108	0.2	168	0.3
II	23478	44.2	16974	32.0	16032	30.2	8754	16.5	6972	13.1	3870	7.2	4020	7.5
III	1878	3.5	1806	3.4	2538	4.7	750	1.4	1164	2.1	1056	1.9	942	1.7
IV	9832	18.5	11344	21.3	20412	38.4	21372	40.3	18364	34.6	11990	22.6	9362	17.6
Total counts	35908		30604		39402		31026		26758		17024		14492	
Residual counts in column	17128	32.6	22432	42.3	13634	25.7	22010	41.5	26278	49.5	36012	68.0	38544	72.7
Effluent	—	—	—	—	168	0.3	194	0.3	324	0.6	1138	2.1	1558	2.9

hemin の counts に対する百分率で示した(使用した放射性 hemin 結晶 1mg は平均 42,428counts/10min. であつた).

第1, 第3層に於ては, 反応直後より低率を示し, 経時的変動を認めなかつた. 第2層は反応直後44.2%を示したが経時的に減少し, 反応16時間で最低値に達し, 24時間値と有意の差を認めなかつた. 第4層に於ては, 反応直後第2層のそのの半分に満ため18.5%であつたが, 反応4時間目には最高値に達して第2層の反応直後値に近づき, 以後ゆるやかな曲線を示しつつ減少した. 又使用した hemin count と測定総 count との差, 即ち水で遊離せず活性 alumina 中に ion 結合のままの放射鉄を計算上求めてみると, 2時間目にやや減少した以外は常に経時的に増量し, 反応8時間で約50%に達し, 反応24時間には72.7%に達した. 各吸着層別の残存鉄量は, 活性 alumina のままでの湿性灰化不能なためと, Fe⁵⁵ の特性上自己吸収を考慮すれば, alumina に吸着させたままでの放射能測定不能のため, この実験方法による測定は不可能であつた. Fe⁵⁹ のγ線を利用すればこの問題は解決されるものと思われる.

b) 易分離鉄よりの検討

水浴離液 5.0 cc を採り, Barkan 及び Walker¹⁹⁾ の方法に従い, これに1.2%塩酸 2.5 cc を加え,

38°C 恒温槽に16時間放置後, 20%三塩化醋酸 1.0 cc を加えてよく混和後濾過し, 濾液全量を採り湿性灰化, 電気鍍金を行つたものを易分離鉄とした. その結果は第4表, 第3図に示す通りであつた.

第2層に於ては反応直後9.0%の低値を示したが, 経時的に増量して, 反応16時間に至り最高値73.6%を示し, 反応24時間値と有意の差を認めなかつた. 第4層に於ては, 反応直後より高値を示し, 経時的消長に有意の差を認めなかつた. 第1, 第3層に於ては高値を示し, 経時的に可成りの増減が認められるが, 総鉄量が少く実験操作上の誤差を考慮すれば, その消長を意味するものは早計と考えられる.

c) 0.4%に塩酸添加直後鉄量よりの検討

水浴離液 5.0 cc を採り, これに1.2%塩酸 2.5 cc を加え, 16時間 38°C 恒温槽に放置する事なく, 直ちに20%三塩化醋酸 1.0 cc を加えて濾過し, 濾液全量を湿性灰化, 電気鍍金した結果は第5表の如くであつた. この場合測定 count と総鉄量 count との百分率で示した.

d) 遊離鉄量よりの検討

水浴離液 5.0 cc を採り, これに1.2%塩酸の代りに蒸溜水 2.5 cc を加え, 20%三塩化醋酸を 1.0 cc 添加後濾過し, 濾液全量を採り湿性灰化, 電気鍍金を行い測定した count と総鉄量 count との百分率で

Tab. 4. Amounts of Easily Split Off Iron. C: Counts

Banp	Immediately		1 hr.		2 hrs.		4 hrs.		8 hrs.		16 hrs.		24 hrs.	
	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%
I	396	55.0	348	72.5	258	61.4	108	72.0	240	93.0	72	66.6	138	82.1
II	2130	9.0	2682	15.8	2808	17.5	4080	46.6	3444	49.3	2850	73.6	2850	70.9
III	954	50.7	1722	95.3	1836	72.3	708	94.6	1140	97.8	912	86.4	918	97.5
IV	12864	87.2	13554	83.6	25302	86.7	25326	82.9	22872	91.4	16092	80.6	19038	94.7

Tab. 5. Iron Amounts added to 0.4% Hcl immediately. C: Counts

Band	Time		1 hr.		2 hrs.		4 hrs.		8 hrs.		16 hrs.		24 hrs.	
	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%
I	90	12.5	132	27.5	162	38.5	90	60.0	210	81.3	30	27.8	120	71.4
II	1092	4.6	1650	9.7	1776	11.0	2250	25.7	2130	30.5	2076	53.7	1788	44.5
III	840	44.7	1080	59.8	948	37.3	468	62.4	702	60.3	894	84.6	588	62.5
IV	10632	72.0	12834	79.1	23928	82.0	20334	66.5	21174	82.2	14430	72.3	15798	78.7

Tab. 6. Amounts of Free Iron. C: Counts

Band	Time		1 hr.		2 hrs.		4 hrs.		8 hrs.		16 hrs.		24 hrs.	
	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%
I	246	34.1	222	46.2	162	38.5	96	64.0	78	30.2	60	55.5	126	75.0
II	618	2.6	1488	8.7	1908	11.9	2904	33.1	1908	27.1	1752	45.2	2196	54.6
III	654	34.8	1218	67.4	1536	60.5	582	77.6	990	85.0	984	93.2	750	79.6
IV	11262	76.3	12558	77.4	23946	82.1	24534	80.3	21600	86.5	16338	81.7	16380	81.6

示すと第6表の如くであつた。

易分離鉄量, 0.4%に塩酸添加直後鉄量, 遊離鉄量の三者につき, 各層別に比較検討を加えると第4, 5, 6, 7図の如くであつた。

6.2. biliverdin 量による各吸着層の検討

吸着層を分割分離し, 33%醋酸 15 cc で溶離し, 醋酸曹達結晶 3 gr を完全に溶解させ, ether 30 cc で抽出して蒸留水で数回水洗後, 10%塩酸と共に振盪し青色々素を塩酸層に移行させ, Pulflich の光度計を用いて測定した結果, 第7表, 第4, 5, 6, 7図に示す如くなつた。即ち第1層には凡んど認められなかつたが, 他の吸着層に於てはすべて4時間目を極大とする曲線がえられた。この塩酸抽出液に sodium dithionite の一刃尖を加えて還元すると, 青色より黄色に変じ, Gmelin 反応, alcohol を加えた後の diazo 反応陽性で, aldehyde 反応及び Schlesinger 反応は陰性であつた。従つてこの黄色々素は bilirubin で, 還元前の青色々素は biliverdin である。

Tab. 7. Biliverdin yields from separated Band. mg %

Band	Time	Immedi-ately	1hr.	2hrs.	4hrs.	8hrs.	16hrs.	24hrs.
I	0	0	0.056	0	0	0	0	0
II	0	0.215	0.308	0.442	0.292	0.273	0.213	0.213
III	0	0.107	0.146	0.261	0.204	0.087	0.052	0.052
IV	0.319	0.669	0.789	0.942	0.497	0.497	0.423	0.423

6.3. 吸収曲線による各吸着層の検討

各吸着層を分割分離した後, 蒸留水で溶出を行つた液につき, Beckman の Recording spectrophotometer Model D. K. により吸収曲線を描き検討を加えた。

第1, 第3層に於ては, 吸収曲線は認められなかつた。

第2層に於ては, 第8図に示す如き曲線がえられた。即ち反応直後 610 m μ に吸収極大を認めたが, 反応2時間目以後消失した。この反応直後及び1時間目をとり, sodium dithionite 及び苛性曹達で還元変性せしめると, 557 m μ 及び 525 m μ の2つの吸収極大が認められた。一方 hemin を N/10 苛性曹達に溶解して吸収曲線を描くと, 610 m μ に吸収極大を認め, 上記曲線に相似した。

第4層に於ては, 第9図に示す如く, 反応直後 660, 530, 500 m μ の3つの吸収極大を認めたが, 反応1時間にして 660 m μ の極大はやや短波長側に移動して 656 m μ となり, 終始この極大が認められた。又反応4時間目には 500 m μ が, 反応24時間目には 530 m μ の山が夫々消失し, 656 m μ の極大のみが残つた。なお反応1時間目をとり, sodium dithionite 及び苛性曹達で還元変性させると, 650 及び 554 m μ の極大が認められた。

滲透液につき吸収曲線を求めたが, 何等特記する吸収極大を認めず, sodium dithionite 及び苛性曹達による還元変性に於ても変化は認められなかつた。

反応4時間目の第4層より, M. Engel¹³⁾ 及び永

井¹⁴⁾の方法で、10%塩酸層に抽出された青色溶液の吸収曲線を求めてみると、655 m μ に吸収極大を有する曲線がえられた。

結 論

Fe⁵⁵ 標識 hemin を20% pyridine 水に溶解し、酸素非通気の下に l-ascorbin 酸を作用させて、各時間毎の反応液につき column chromatography を行い、分割しえた各吸着層の水溶離液について検討を加え、以下の所見をえた。

1. 反応各時間毎の chromatogram は終始4層に分割し、夫々色調と配分を異にした。而して第4層は種々の試みにも拘わらず、吸着柱内に留めえず流下液として採取した。

2. 総鉄量は各時間吸着層に於て夫々配分を異にしたが、水で溶離せずに吸着柱内にイオン結合のまま留る鉄が存在し、反応進行と共にその量は増大した。

3. 第1層の総鉄量は僅微で痕跡程度に留り、その大部分は易分離鉄であつた。biliverdin は抽出不能で、特記する吸収曲線がえられなかつた。

4. 第2層は総鉄量の経時的減少とは逆に、易分離鉄は経時的に増量し、biliverdin の収量は4時間目を最大とした。吸収曲線に於ては、反応直後及び1時間に610 m μ の吸収極大を認め、pyridine-hemochromogen 乃至 pyridine-hemichromogen 吸着されていると思われた。

5. 第3層は総鉄量が僅微でその大部分は易分離鉄であつた。biliverdin 収量は4時間目を最大としたが、吸収曲線はえられなかつた。

6. 第4層の総鉄量は4時間目を最大とする曲線を描くが、易分離鉄量は終始高値を示して経時的変動に乏しかつた。biliverdin はこの層に最も多量に抽出され、収量は4時間目を最大とした。吸収曲線に於ては、反応初期に656, 530, 500 m μ の3つの極大を認め protoverdohemochrome のそれと一致し、反応時間の経過と共に656 m μ の pyridine-verdohemochromogen に一致した。

7. 易分離鉄量と塩酸添加直後鉄量及び所謂遊離鉄量とは並行関係を示すが、常に易分離鉄量が優位を示した。而して易分離鉄量と biliverdin 収量とは並行関係を示さなかつた。

8. 滲透液は反応2時間目以後認められ、最初は淡黄色を呈するが経時的に褐色調を増す。又総鉄量は経時的に増量するが、特記する吸収曲線はえられず、bilirubin を定性的に証明しえなかつた。

主 要 文 献

- 1) O. Warburg & E. Negelein: Ber. dtsh. chem. Ges., 63, (1930), 1816.
- 2) R. Lemberg: Bioch. J. 29, (1935), 1322.
- 3) R. Lemberg & J. W. Legge: Hematin compounds and bile pigments. Interscience Publishers Inc. New York, (1949).
- 4) H. Fischer & H. Libowitzky: Z. physiol. chem. 251, (1937), 198.
- 5) G. Barkan: Z. physiol. chem. 148, (1925), 124.; 171, (1927), 179.; 244, (1936), 81.
- 6) 武谷: 生化学, 21巻, (昭25), 134.
- 7) 菊池: 生化学, 21巻, (昭24), 174.
- 8) R. Lemberg, J. W. Legge & W. H. Lockwood: Bioch. J. 35, (1941), 328, 339, 353, 363.
- 9) 湯浅: 医学研究, 24巻, (昭29), 1353.
- 10) 寺尾: 医学研究, 25巻, (昭30), 239.
- 11) 栢管: 医学研究, 27巻, (昭32), 1960.
- 12) 間賀: 医学研究, 26巻, (昭31), 2053.
- 13) M. Engel: Z. physiol. chem. 266, (1940), 135.
- 14) 永井: 医学研究, 22巻, (昭27), 124.
- 15) 菊池: 生化学, 22巻, (1950), 214.
- 16) G. J. Vosburgh, L. B. Flexner and D. B. Cowie: J. Biol. chem. 175, (1948), 391.
- 17) 菊池: 標準生化学実験, 133.
- 18) 木戸: 医学研究, 25, (昭30), 1253.
- 19) G. Barkan & B. S. Walker: J. Biol. chem. 135, (1940), 37.
- 20) W. C. Peacock: J. clin. Invest. 25, (1946), 605.
- 21) 川口: 医学研究, 27巻, (昭32), 1002.

Studies on Intermediate Products of Bile Pigment Formation Utilizing Radioactive Iron in Vitro.

Part 1. Chromatographic Studies on Intermediate Products from Pyridine-hematin to Bile Pigment

By

Koji Kikkawa

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

Traceable Fe 55 hemin was dissolved in 20% pyridine water solution, then 1-ascorbic acid was reacted in absence of oxygen. Column chromatography was observed on the reaction mixture of each reacting time. Studies were made on the water solution of the divisible absorption layers and following deductions were obtained.

1) Hourly observations of chromatogram were always in 4 layers and their respective colors and distributions were different. Additionally the fourth layer, due to the failure of retaining it in the absorption column in spite of various manipulations attempted, was collected as a gravity flow effluent.

2) Distribution of the total iron was different with respective layer and reacting time, but there was iron which would not dissolve in water due its remaining in the absorption column under ionic combination and with increased with the reaction progress.

3) Total iron in the first layer was very small i.e. traceable degree and the greater part of it was easily split off iron. Biliverdin was undetectable therefore absorption curve worth mentioning was obtainable.

4) Conversely with the hourly decrease of total iron in the second layer, easily split off iron increased with the reaction progress. The amount of Biliverdin was highest at the end of four hours. In the absorption curve the peak absorptions of 610 m μ was observed right after the initiation of reaction and after one hour which was believed to be due to pyridine-hemichromogen being absorbed.

5) Total iron of the third layer was exceedingly small and most part of it was easily split off iron. The quantity of Biliverdin was highest at the end of fourth hour. Absorption curve was not obtainable.

6) For the fourth layer total iron showed the peak at the end of four hours but the value for the easily split off iron was relatively high throughout and little deflection was observed for all reaction progress. Biliverdin content was highest in this layer and highest at the fourth hour. With reference to the absorption curve at the initial reaction stage 3 maximum peaks of 656, 530 and 500 m μ were observed. This was parallel with protoverdo-hemochrome. With the progress of reaction this was equal with the 656 m μ of pyridine-verdohemochromogen.

7) The quantity of easily split off iron, that of iron just after the addition of hydrochloric acid and so called free iron was parallel but value of easily split off iron content was higher throughout. Moreover the quantity of easily split off iron and Biliverdin quantity did not show parallel relation to each other.

8) Permeating liquid could be observed after 2 hours reaction. The colour of the liquid was light straw at the beginning and as the time elapsed brownish tinge increased. Also the quantity of total iron increased with time lapse but notable absorption curve was not obtainable. Presence of Biliverdin could not be proven qualitatively.