

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 2 編

血色素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〕

血色素より胆汁色素への分解過程に生ずる中間産物は verdohemoglobin¹⁾ と呼ばれ、このものは 0.4% に塩酸を加えると遊離する所謂易分離鉄²⁾ と同一の中間産物と考えられている。

第1編に於ては、放射性鉄 Fe⁵⁵ を利用して、Pyridine-hematin より胆汁色素生成中間産物 verdohemochrome につき、試験管内に於て主として鉄の消長面より検討を加え、その性状の一端を明らかにしたのであるが、本編に於ては、hemin に代り血色素を用い、胆汁色素生成過程に於る中間産物を鉄の消長面より追求し、合せて教室従来の成績の測定上不可避であつた誤差を補填すべく、放射性鉄 Fe⁵⁵ を追跡子として実験を進めることにした。

実験材料には、充分に瀉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頻回に注入して、Fe⁵⁵ 標識赤血球をえて、M. Engel³⁾ 及び永井⁴⁾ の方法に倣い、放射性血色素液を調製して使用し、反応液は、放射性血色素液 1.0 cc に、pH 7.1 の M/15 Soerensen 磷酸塩緩衝液 13.5 cc と、l-ascorbin 酸結晶 100 mg を蒸留水 1.0 cc に溶解し、N/10 苛性曹達 4.5 cc で中和したものを加えて、toluene を重畳することなく、38°C 恒温槽に酸素非通気のまま放置し、反応直後、1, 2, 4, 8, 16 及び 24 時間後に夫々恒温槽より取出し、遠心沈澱により沈澱物を除いた上清を 5.0 cc 採り、column chromatography を行つた。chromatograph 吸着剤は、第1編と同様に、Brockmann 製活性 alumina を使用し、展開剤も、水、ether, chloroform, methanol, pH 7.1 M/15 Soerensen 磷酸塩緩衝液等検討の結果、第1編と同様に磷酸塩緩衝 5.0 cc を使用した。

斯様にしてえられた各時間毎の chromatogram は、第1図に示す如くであつた。即ち反応直後上端より赤色、無色の層を隔てて淡緑色、暗緑褐色及び淡赤色の4層を認めた。反応1時間目には第1層の赤血層は赤褐色に変じ、無色の層は薄くなり淡緑色層は増大した。第1層は2時間目以後灰褐色に変じ、終始この色を呈した。第2層は、反応8時間目まで淡緑色を呈したが、16時間目以後黄褐色調を増し、第3層の暗緑褐色層は、反応2, 4時間目には暗緑色、反応8, 16時間目には再び暗緑褐色を呈し、反応24時間目には淡褐色となつた。第4層の淡赤色層は、時間の経過と共に層の厚さを増したが、反応8時間目以後は第3層と混じて境界は不明瞭となり、一括して第3層として検討を加える事にした。反応4時間目には、淡黄色の滲透液を認めるようになり、時間の経過と共に次第にその色調を増す傾向が認められた。

既に主要な各吸着層についての一般性状に関しては、教室寺尾⁵⁾、間賀⁶⁾ が夫々活性 alumina 及び silicagel の chromatography により、詳細に検討を加えて報告しており、特に反応初期にみられる赤褐色層は、血色素若しくは methemoglobin よりなり、淡赤色層は hemoglobin 若しくは hemichromogen であることを決定した。又他の吸着層に関しても検討を加えて、血色素より胆汁色素への分解過程に於る主要分解過程と、副行的分解過程を仮定している。そこで一応これ等の問題には触れず、中間産物の鉄の動行に焦点を置いて、更に検討を加えることにした。

既に冒頭にも述べた如く、血色素より胆汁色素への分解過程に於ける中間産物として、verdohemo-

globin と総称される近似物質群を生じ、このものは 0.4% の割合に塩酸を加えて 16 時間 38°C に放置すると、Barkan の我謂易分離鉄²⁷⁾ を遊離するという共通の性質を有するものとされている。そこで血色素と、1-ascorbin 酸及び分子酸素反応に於て、経時的に chromatography による verdohemoglobin の各分割に於る易分離鉄量の消長を以て追求したのであるが、この際同時に総鉄量を測定し、更に鉄遊離の容易性から各段階のものが存在するのではないかと云う想定のもとに、同時に 0.4 % の割合に塩酸添加直後鉄量及び塩酸に代えて水を用いる所謂遊離鉄量をも合せて検討し⁸⁾、その相互関係につき考察を加えることにした。

各反応時間吸着層の総鉄量は、第 2 表、第 2 図に示す如くであつた。この際使用総 count に対する各層 count の百分率で示した。即ち第 1 層に於ては、反応直後には 10.7% と低値であつたが、経時的に増量し、反 24 時間には 48.0 % となり、使用総 count の約半分が第 1 層に集中した。第 2 層に於ては、反応初期には 2 % 前後であるが、反応 2 時間目以後は凡 10% 前後の定値を示し、時間的変動に乏しかつた。これ等に反して、第 3 層に於ては、反応直後より 42.8% の高値を示し、以後緩やかに増量して、反応 4 時間目には 58.0% と最高値となり、以後緩やかな曲線を描きつつ漸次減少するが、反応 24 時間目に於てもなお 38.4% の高値を示した。第 4 層に於ては、反応直後 43.9% の高値であつたが、経時的に急速に減少した。なお無色の層及び滲透液の鉄量は痕跡程度に留り、その意義は無いものと思われた。以上の如く総鉄量のみから考察しても、血色素より胆汁色素への分解過程に於いて、経時的に chromatography の分配及び色を異にする種々の近似物質群を生じ、夫々鉄の分配を異にすることがわかる。

0.4 % の割合に塩酸を加え、38°C 恒温槽に 16 時間放置し遊離する所謂易分離鉄量を測定し、総鉄量に対する百分率で示すと、第 3 表、第 3 図の如くであつた。第 1 層に於ては、反応直後 11.1% であつたが、経時的に急速に増量し、反応 16 時間目には 58.2% の最高値に達し、総鉄量の経時的増量との並行関係が認められた。即ち第 1 層に於いては、反応の進行と共に鉄量を増すが、その大部分は易分離鉄の増量であることがわかる。第 2 層に於いては、反応直後及び 1 時間目に於て、夫々 46.9%、43.7% の高値を示したが、以後急速に減少した。第 3 層に於いては、総鉄量の多いのに反して、易分離鉄量は極めて僅少

であり、反応 2 時間目の最高値に於てすら 9.1 % を示すに過ぎなかつた。第 4 層に於ては、総鉄量の経時的な急速の下降がみられたのに反して、急速な増量が認められた。

以上総鉄量及び易分離鉄量のみから考察しても、血色素より胆汁色素への分解過程に於る中間産物 verdohemoglobin の性状の多様性を十分に観察しえたものと思われ、第 1、第 4 層に於いては、鉄遊離の困難な状態より出発して経時的に鉄遊離の容易な状態への変遷が窺われるのに反して、第 2 層に於いては、逆に経時的に鉄遊離の困難な状態へと変じ、第 3 層に於いては、終始鉄遊離困難な状態を固持した。

塩酸による鉄遊離の難易を検討するために、0.4 % に塩酸添加直後鉄量を測定し、更に三塩化醋酸による鉄遊離の可否を考慮して、教室湯浅⁸⁾ が先に検討した如く、塩酸の代りに蒸溜水、次いで 20% 三塩化醋酸を加えて除蛋白し、その濾液について測定した自然遊離の所謂遊離鉄についても検討を加えてみた。その結果は第 4 表、第 5 表に示す如くであり、これを各層別に易分離鉄量との比較に於て図示したのが、第 4、5、6、7 図である。即ち、易分離鉄量、0.4 % に塩酸添加直後鉄量及び所謂遊離鉄量の三者の間には、ほぼ並行関係を認め、上述の順に鉄量の減少がみられ、易分離鉄量が常に優位を示した。而して所謂遊離鉄量は、第 2 層の反応直後及び 1 時間値を除き、他は総て 10% 内外の痕跡程度に留つたが、自然遊離の鉄の存在は明らかである。第 1 層に於ては、他の 3 層と異り、易分離鉄、塩酸添加直後鉄及び所謂遊離鉄量の間には大きな距りを認め、経時的易分離鉄量の増加は、biliverdin 収量の多いことと相まつて、第 4 層中最も verdohemoglobin を多量に含有したものと思われ、血色素より胆汁色素への分解の主要過程と目され、端的にその性状の一端を窺いえたものと考えられる。又易分離鉄量と塩酸添加直後鉄量との比較に於いて、反応初期には、両者の間は僅少の差で、易分離鉄の大部分が塩酸添加直後鉄量であつたにも拘わらず、反応進行と共に両者間の差は大となり、酸による時間的鉄遊離容易な物質より、次第に難易の物質への転換を窺うことが出来る。他の 3 層に於いては、3 者間の距りは僅少であり、容易にイオン化する性質をもつことが窺える。三塩化醋酸による鉄遊離の可否につき、G. Barkan²⁾ 及び R. Lemberg⁹⁾ は遊離しないと述べ、教室湯浅⁸⁾ もその問題に関する直接の実験は行っていないが、

遊離鉄が時間の経過と共に増加して易分離鉄（総鉄量として述べている）に著しく接近する事実より、三塩化醋酸が鉄を遊離せぬ限り、verdohemoglobin 乃至その誘導体は種々変化する過程に於いて、biliverdin 核の分解を伴い、自ら鉄を遊離するに至り、更には verdohemoglobin を経ぬ分解も考慮されると述べているが、以上の実験に於いては、第2層の反応直後及び1時間目を除き、常に低値を示して10%以下に留り、遊離鉄の経時的増量を認めず、一方又易分離鉄量及び0.4%に塩酸添加直後鉄量には常に及ばない事実からすれば、塩酸には及ばないが三塩化醋酸による鉄遊離が考慮されるべきか又は三塩化醋酸によらずに全く自然に遊離する鉄が存在するか何れかである。何れにせよ第2層の反応初期に於いては、遊離鉄量は易分離鉄量及び塩酸添加直後鉄量と共に高値を示し、易分離鉄の大部分を遊離鉄が占め、イオン化し易い鉄を多量に含有する物質であることがわかる。

各時間吸着層を分割分離し、M. Engel³⁾ の biliverdin 抽出法に倣い、20 cc の蒸留水と 10 cc の氷醋酸を加えて溶解すると、緑色乃至褐緑色を呈し、これに醋酸曹達結晶 6 gr を加えて完全に溶解させ、30 cc の ether で抽出を行い、分離した ether 層を数回水洗し、0.5%塩酸 20 cc を加えてよく振盪すると、青色色素が 0.5%塩酸層に移行した。この青色色素の吸収曲線を求めてみると、655 m μ に吸収極大を示した。また塩酸抽出液に、sodium dithionite 一刃尖を加えて還元すると黄色に変じ、chloroform を加えて振盪すると、黄色色素は chloroform 層に移行した。この chloroform 層につき定性反応を行うと、Gmelin 反応及び alcohol を加えた後の diazo 反応は陽性で、aldehyde 反応及び Schlesinger 反応は陰性であつた。従つてこの黄色色素は bilirubin であり、還元前の青色色素は、吸収曲線と相まつて biliverdin と云いうる。各時間吸着層より biliverdin を抽出し、Pulfrich の光度計を用いて測定した結果は、第6表、第4, 5, 6, 7 図に示す如くであり、第1, 2, 3 層には相当量にその抽出をみたが、第4層には僅微であつた。又第1層に於ては反応8時間目に、第2, 3, 4 層に於てはこれより早く反応4時間目に夫々収量の極大を認め、易分離鉄とは並行関係を示さなかつた。又各吸着層は、これを33%醋酸で溶離した後、sulfosalicyl 酸水溶液を加えると蛋白反応を呈した。滲透液は反応初期に於いては無色であるが、反応4時間目以後淡黄色となり、

経時的に黄色調を増す傾向が認められ、前述の如く総鉄量は痕跡程度に留つた。N/10 塩酸を加えて、chloroform で抽出すると、黄色色素が chloroform に移行し、このものは Gmelin 反応及び alcohol を加えた後の diazo 反応が陽性で、sulfosalicyl 酸による蛋白反応は陽性であつたところより、このものは bilirubin である。

以上より血色素から胆汁色素への分解過程に於ける中間産物 verdohemoglobin は、column chromatogram に於る経時的な色調や配分を異にし、更には易分離鉄を含む共通の性状を認めるにしても、夫々酸による鉄脱離性を異にする等、種々の段階のものより構成されることが分る。即ち従来 verdohemoglobin と呼称された中間物質は、補欠族の面からは biliverdin の抽出が可能で、その抽出程度が種々であると共に、補欠族による色調を異にし、一方鉄遊離の難易では種々の程度が証明され、更にこれ等に変性 globin の配位を証明された。これらの中、反応進行状態を易分離鉄の消長より考察すれば、先づ第2層が反応初期には先導となり、次第に第1, 第4層にその主導権をゆずり、漸次第1層が優位を示して血色素より胆汁色素へと分解が進むものと考えられる。

実験の部

1. 実験材料

1. 1. 放射性鉄

放射性鉄は、米国 Oak Ridge National Laboratory より輸入された $\text{Fe}^{59}\text{-Cl}_3$ の塩酸溶液を使用した。 Fe^{59} は半減期47日で、 γ 線と低エネルギーの β 線を発する。夫々 0.26 m. e. v. 及び 0.46 m. e. v. の最大エネルギーをもつほぼ等しい強さの2種の成分よりなる β 線スペクトルを有し、低エネルギーの β 粒子は、1.30 m. e. v. の γ 線、高エネルギーの β 粒子は 1.10 m. e. v. の γ 線を伴っている。

1. 2. 放射性鉄の精製¹⁰⁾

1. 3. 材料家兎の調製

以上は第1編に準じて行つた。

1. 4. 放射性血色素の調製。

M. Engel³⁾の方法に倣い、新鮮家兎血液より調製した。

1. 5. 血色素濃度の定量。

L. Heilmeyer-平出¹¹⁾の変法に倣つた。

1. 6. 血色素液の放射能に関する検討。

第1編に述べた如く、血色素液の specific activity

は高いことが要求されるので特にこの点に留意し、而も反応進行上の適当な血色素濃度を考慮した結果、本実験使用当初の血色素溶液 1.0 cc は、平均 126,500 counts/10 min. であった。

2. 実験方法.

2. 1. 反応液の調製.

上述の方法で調製した濃度 12.29 g % の Fe^{59} 標識血色素溶液 1.0 cc を三角コルベンに採り、これに pH 7.1 M/15 Soerensen 磷酸緩衝液 13.5 cc と l-ascorbin 酸結晶 100 mg を蒸留水 1.0 cc に溶解し、N/10 苛性曹達 4.5 cc で中和したものを加え、toruol を重畳することなく密栓して 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 時間後に於いて、各時間毎の反応液から沈澱物を遠心沈澱により除いて各 5.0 cc を採り column chromatography を行つた。

2. 2. chromatography 吸着柱の作製法.

第 1 編の方法に倣い、Brockman 製活性 alumina を使用した。吸着柱の高さに関しては、第 1 編の如き流下層を認めないため、分配と展開時間を考慮して 10 cm とした。展開剤としては第 1 編と同様に、pH 7.1 M/15 Soerensen 磷酸塩緩衝液 5.0 cc を使用した。

3. 測定方法.

3. 1. biliverdin の定量法.

M. Engel³⁾ 及び永井⁴⁾ の方法に倣つた。

3. 2. 吸収曲線描写法.

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

3. 3. 易分離鉄定量法.

Barkan 及び Walker¹²⁾ の方法に準じた。

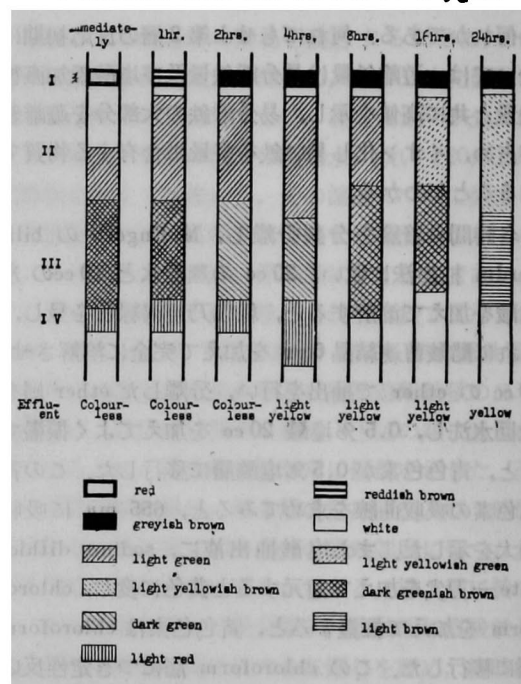
3. 4. Fe^{59} 定量法.

Fe^{59} は第 1 編に述べた如く、弱い X 線のみを放射するために、自己吸収による測定誤差を考慮して、湿性灰化、電気鍍金という煩雑な手技を要したのであるが、本編に於ては Fe^{59} の γ 線を利用して測定したため、測定手技は著しく簡略化された。即ち試料を直径 1.5 cm、深さ 1.0 cm のガラス製容器にとり、神戸工業製の Scintillation Counter Model E. A. -13 を使用し、測定距離を 1.0 cm として計測を行つた。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い、その都度血色素溶液 1.0 cc の計数を測定し、使用当初の血色素溶液 1.0 cc の測定計数値と対比して、第 1 表の如くして放射能減衰による誤差を補正した。なお計数時間は第 1 編と同

Tab. 1. Correctness for Decay of Radioactivity.

	Hb 1.0cc Counts/10min.	Index for Correctness
Immediately	126500	1
1hr.	118724	1.06
2hrs.	113264	1.11
4hrs.	108626	1.16
8hrs.	108010	1.17
16hrs.	108010	1.17
24hrs.	103918	1.21

Fig. 1. Comparative Diagram of Hourly Chromatograms and Effluent of the Resulting Solution of Hemoglobin under Influences of l-Ascorbic Acid and absence of Oxygen.



様に 10 分計測とした。

4. 反応液の Chromatography と時間毎の chromatogram

上述吸着柱に元づ蒸留水を流して全体が湿り、かつ気泡を駆逐した、各時間反応液を恒温槽より取出して遠沈分離した上清 5.0 cc を採り、静かに column に注入して自然に滲透させ、全部滲透を終ると直ちに展開剤として pH 7.1 M/15 Soerensen 磷酸塩緩衝液 5.0 cc を注入して chromatogram を作製した。

反応各時間毎の chromatogram は第 1 図に示す如く、反応 4 時間目までは 4 層に、以後の時間に於ては 3 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。反応 4 時間目以後に於ては淡黄

色乃至黄色の滲透液をみとめた。

5. 各吸着層に関する検討。

5. 1. 鉄量による各吸着層の検討。

5. 1. 1. 総鉄量による検討。

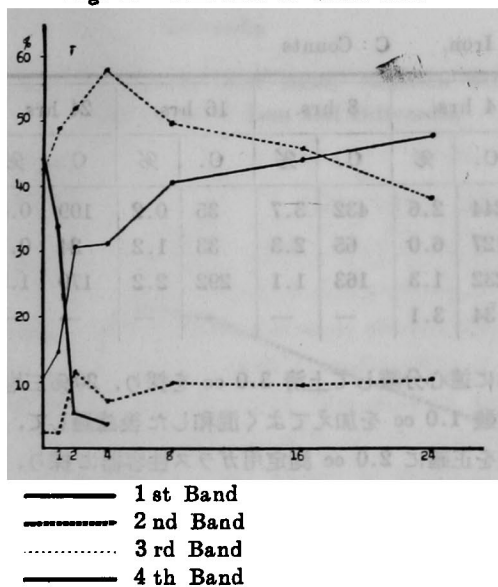
各吸着層を分割分離し、38°C 恒温槽に1昼夜放置して充分乾燥させ、乳鉢でよくすつて均等となし

た後に全量を秤量し、その 1.0 gr を前述の計測用容器に採り、表面を平坦となるようにして自己吸収を一定となして後 Scintillation Counter を用いて計測を行つた。その結果は第2表、第2図の如くなつた。

Tab. 2. Amounts of Total Iron. C: Counts

Band	Time		Immediately		1 hr.		2 hrs.		4 hrs.		8 hrs.		16 hrs.		24 hrs.	
			C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%
I			3070	10.7	4228	14.7	8644	30.8	9104	31.2	11674	40.9	12698	44.3	13506	48.0
II			704	2.4	652	2.3	3248	11.6	2092	7.2	2854	10.0	2734	9.6	3088	10.9
III			12248	42.8	14176	49.3	14640	52.2	16954	58.0	14130	49.6	13188	46.0	10800	38.4
IV			12580	43.9	9716	33.8	1534	5.5	1068	3.6	—	—	—	—	—	—
Total			28602		28772		28066		29218		28541		28622		28114	

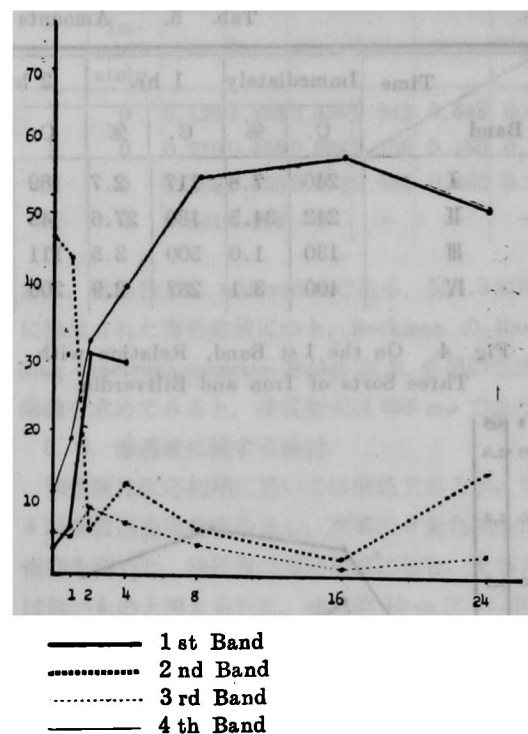
Fig. 2. Amounts of Total Iron



5. 1. 2. 易分離鉄による検討。

column chromatography により分割分離した各吸着層を分離し、これに蒸留水 5.0 cc を加え、更に 1.2 % 塩酸 2.5 cc を加え、38°C 恒温槽に16時

Fig. 3. Amounts of Easily Split Off Iron



Tab. 3. Amounts of Easily Split Off Iron. C: Counts

Band	Time		Immediately		1 hr.		2 hrs.		4 hrs.		8 hrs.		16 hrs.		24 hrs.	
			C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%
I			340	11.1	798	18.9	2767	32.1	3602	39.6	6458	55.4	7394	58.2	6912	51.1
II			220	46.9	287	43.7	200	6.1	267	12.7	187	6.5	70	2.5	462	14.9
III			690	5.6	788	5.5	1339	9.1	1266	7.4	608	4.3	175	1.3	340	3.1
IV			430	3.4	670	6.7	468	30.5	313	29.3	—	—	—	—	—	—

間放置した後、これを遠心分離してえた上清 3.0 cc に 20% 三塩化醋酸 1.0 cc を加えてよく混和後濾過し、濾液を正確に 2.0 cc 採り、測定用ガラス性容器に入れて測定を行つた結果は、第 3 表、第 3 図に示す如くなつた。

5. 1. 3. 0.4 % に塩酸添加直後鉄量よりの検討.
column chromatography により分割分離した各

Tab. 4. Iron amounts added to 0.4% Hcl immediately. C: Counts

Band	Time		Immediately		1 hr.		2 hrs.		4 hrs.		8 hrs.		16 hrs.		24 hrs.	
			C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%
I			240	7.8	468	11.1	1417	16.4	1638	18.0	2316	20.0	2141	16.9	1679	12.4
II			299	42.5	238	36.5	107	3.3	228	10.9	108	3.8	52	1.9	158	5.1
III			460	4.1	468	3.3	1283	8.8	592	5.9	257	1.8	105	0.8	304	2.8
IV			100	0.7	447	4.6	306	19.6	58	5.4	—	—	—	—	—	—

5. 1. 4. 所謂遊離鉄量よりの検討.
column chromatography により分割分離した各

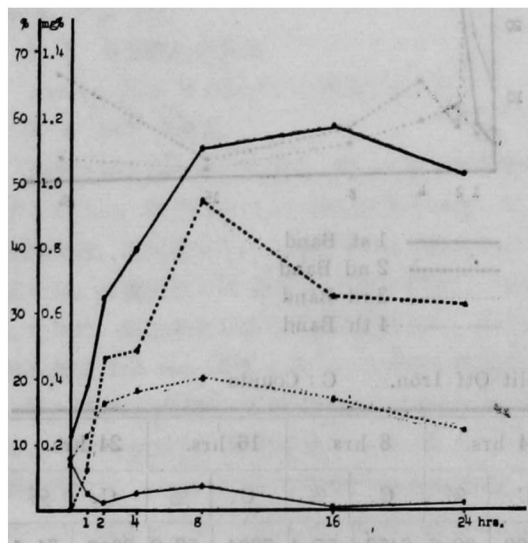
吸着層を分離し、これに蒸留水 5.0 cc を加え、更に 1.2 % 塩酸 2.5 cc を加えて後、恒温槽に放置することなく直ちに遠心分離してえた上清 3.0 cc に、20% 三塩化醋酸 1.0 cc を加えてよく混和した後濾過し、濾液を正確に 2.0 cc 測定用ガラス性容器に採り、測定した結果は第 4 表に示す如くであつた。

吸着層を夫々分離し、これに蒸留水 5.0 cc を加え、更に 1.2 % 塩酸の代りに蒸留水 2.5 cc を加え、直

Tab. 5. Amounts of Free Iron. C: Counts

Band	Time		Immediately		1 hr.		2 hrs.		4 hrs.		8 hrs.		16 hrs.		24 hrs.	
			C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%	C.	%
I			240	7.8	117	2.7	89	1.0	244	2.6	432	3.7	35	0.2	109	0.8
II			242	34.5	180	27.6	43	1.6	127	6.0	65	2.3	33	1.2	24	0.7
III			130	1.0	500	3.5	111	0.7	232	1.3	163	1.1	292	2.2	170	1.5
IV			400	3.1	287	2.9	200	13.0	34	3.1	—	—	—	—	—	—

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



— Easily Split Off Iron
 0.4% Hcl
 - - - Free Iron
 - · - Biliverdin

ちに遠心分離して上清 3.0 cc を採り、20% 三塩化醋酸 1.0 cc を加えてよく混和した後濾過して、濾液を正確に 2.0 cc 測定用ガラス性容器に採り、測定した結果は第 5 表に示す如くなつた。

易分離鉄量、0.4 % に塩酸添加直後鉄量、所謂遊離鉄量の 3 者につき、各層別に比較検討を加えると、第 4, 5, 6, 7 図に示す如くであつた。

5. 2. biliverdin 量による各吸着層の検討.

column chromatography により分割しえた各吸着層を夫々分離し、これに蒸留水 20 cc と氷醋酸 10 cc とを加えてよく振盪すると淡緑色物質が溶離された。これを遠心沈澱してえた溶離液に、醋酸曹達結晶 6 gr を完全に溶解させ、30 cc の ether で抽出を行い、抽出しえた ether 層を蒸留水で数回洗滌した後、0.5 % 塩酸 20 cc を加えて振盪すると、色素は塩酸層に容易に移行して青色を呈した。この青色溶液につき、Pulfrich の光度計を用いて測定を行つた結果は第 6 表、第 4, 5, 6, 7 図に示す如く

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

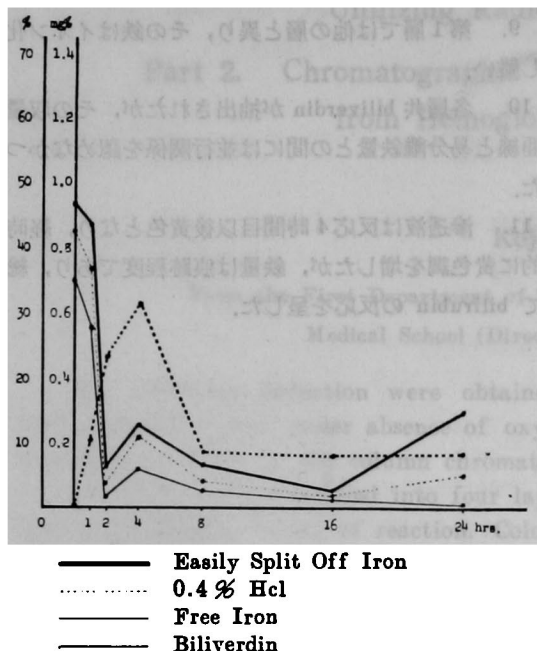
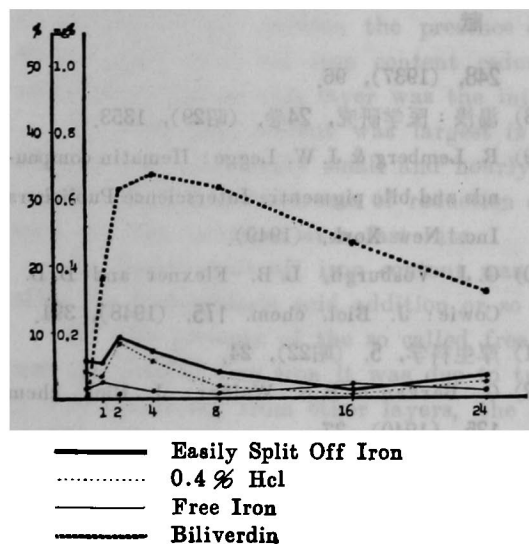


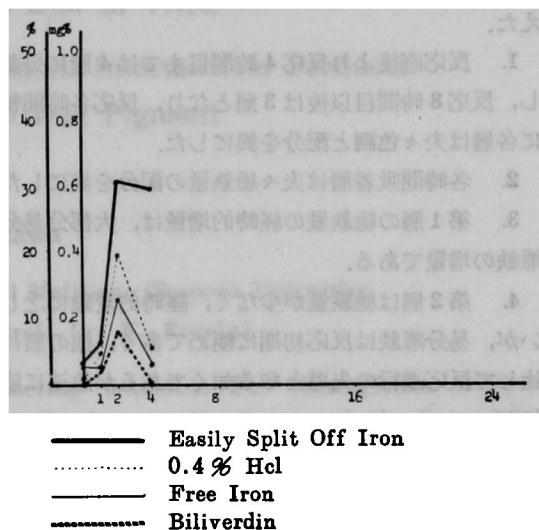
Fig. 6. On the 3rd Band, Relation with Three Sorts of Iron and Biliverdin



であつた。

即ち第1層に於いては8時間目、第2、第3層に於ては4時間目、第4層に於ては2乃至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 の一ノ尖を加えて還元すると、青色より黄色に变じ、黄色色素が chloroform に抽出された。chloroform 溶液に於いて黄色色素は、Gmelin 反応陽性、alcohol を加えた後の diazo 反応陽性、aldehyde 及び Schlesinger 反応は何れも陰性であつた。従つて黄色色素は間接 bilirubin で

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



Tab. 6. Biliverdin yield from each separated band. mg %.

	Im-medi-ately.	1hr.	2hrs.	4hrs.	8hrs.	16hrs.	24hrs.
I	0	0.126	0.468	0.486	0.942	0.648	0.628
II	0	0.210	0.468	0.624	0.156	0.156	0.162
III	0	0.366	0.630	0.672	0.636	0.462	0.319
IV	0	0.061	0.156	0	—	—	—

あり、青色色素は biliverdin である。又 0.5% 塩酸に抽出された青色溶液につき、Beckman の Recording Spectrophotometer Model D. K. を用いて吸収曲線を求めてみると、吸収極大は 655 mμ であつた。

5. 3. 滲透液に関する検討。

滲透液は反応初期に於いては無色であるが、反応4時間目以後淡黄色を呈し、次第にその黄色調を増す傾向を認めた。総鉄量は痕跡程度に留り、その意義は無いものと考えられた。滲透液 10 cc に N/10 塩酸 2 cc を加え、chloroform で抽出すると、chloroform 層は黄色となり、このものは Gmelin 反応及び alcohol を加えた後の diazo 反応は陽性であり、又 sulfosalicyl 酸による蛋白反応も陽性であつた。

5. 4. 各吸着層の蛋白反応。

各時間吸着層を分割分離し、33% 醋酸で溶離して sulfosalicyl 酸で蛋白定性反応を行うと、全て陽性であつた。

結 論

Fe⁵⁹ 標識血色素溶液に、酸素非通気の下で 1-as-

corbin 酸を作用させて生ずる中間産物を、経時的に column chromatography で分割して以下の所見をえた。

1. 反応直後より反応4時間目までは4層に分割し、反応8時間目以後は3層となり、反応各時間毎に各層は夫々色調と配分を異にした。
2. 各時間吸着層は夫々総鉄量の配分を異にした。
3. 第1層の総鉄量の経時的増量は、大部分易分離鉄の増量である。
4. 第2層は総鉄量が少なく、経時的変動に乏しいが、易分離鉄は反応初期に極めて多く、他の層に比して反応進行の先導となる如くであるが急速に感じた。
5. 第3層は総鉄量が最も多いのであるが、易分離鉄量は極めて僅少であり、経時的変動に乏しい。
6. 第4層は総鉄量の急速下降に反して、易分離鉄は急速に増量する。
7. 易分離鉄量は、塩酸添加直後鉄量及び所謂遊離鉄より常に優位を示す。
8. 所謂遊離鉄の存在は明らかであるが、自然遊

離の鉄か、三塩化醋酸による鉄遊離かは不明であつた。

9. 第1層では他の層と異り、その鉄はイオン化し難い。
10. 各層共 biliverdin が抽出されたが、その収量曲線と易分離鉄量との間には並行関係を認めなかつた。
11. 滲透液は反応4時間目以後黄色となり、経時的に黄色調を増したが、鉄量は痕跡程度であり、総て bilirubin の反応を呈した。

主 要 文 献

- 1) R. Lemberg, J. W. Legge & W. H. Lockwood: Bioch. J. **35**, (1941), 328, 339, 353, 363.
- 2) G. Barkan Z. physiol. chem. **148**, (1925), 124.; **171**, (1927), 179.; **221**, (1933), 241., **236**, (1935), 197.; **244**, (1936), 81.
- 3) M. Engel: Z. physiol. chem. **256**, (1940), 135.
- 4) 永井: 医学研究, **22**巻, (昭27), 124.
- 5) 寺尾: 医学研究, **25**巻, (昭30), 239.
- 6) 間賀: 医学研究, **26**巻, (昭31), 2053.
- 7) G. Barkan & O. Schales: Z. physiol. chem. **248**, (1937), 96.
- 8) 湯浅: 医学研究, **24**巻, (昭29), 1353.
- 9) R. Lemberg & J. W. Legge: Hematin compounds and bile pigmentr. Interscience Publishers Inc. New York, (1949).
- 10) G. J. Vosburgh, L. B. Flexner and D. B. Cowie: J. Biol. chem. **175**, (1948), 391.
- 11) 厚生科学, **5**, (昭22), 24.
- 12) G. Barkan & B. S. Walker: J. Biol. chem. **135**, (1940), 37.

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

Part 2. Chromatographic Studies on Intermediate Products
from Hemoglobin to Bile Pigment

By

Koji Kikkawa

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

The following deduction were obtained, reacting traceable Fe^{69} hemoglobin solution with 1-ascorbic acid under absence of oxygen, and subsequently observed the formed intermediate products in the column chromatography as the time elapsed.

1) The column stratified into four layers in 4 hours after initial reaction and into 3 layers 8 hours after start of reaction. Colors and distribution of strata differed at corresponding reaction times.

2) Total iron distribution differed with corresponding absorption layer and reaction time.

3) The hourly increase of total iron in the first stratum was due mostly to increase of easily split off iron.

4) Total iron content of second layer was small and hourly change was minute, however at the start of the reaction the presence of easily split off iron was exceedingly large. Although easily split off iron content reduction was fast in comparison with other layers it appeared as though this layer was the initiator of reaction progress.

5) Total iron content was largest in the third layer, but the quantity of easily split off iron was exceedingly small and hourly change was lacking.

6) Against the fast rate of reduction of total iron content of the fourth layer, the easily split off iron increased at a fast rate.

7) Easily split off iron content was always higher than the iron content immediately after the hydrochloric acid addition or so called free iron.

8) The presence of the so called free iron is obvious, but it was not clear whether it was the natural free iron it was due to trichloro-acetic acid.

9) Differing from other layers, the iron in the first layer was harder to ionize.

10) Biliverdin was analysed from all layers but parallel between its content and that of easily split off iron was not recognized.
