- (1927).
 (2) Lock., Z. physiol. chem., 216: 17 (1933).
 (3) Gulhmann et al., Arch. Gynäk., 147 : 469 (1931).
 (4) Moor et al., J. clin. invest., 16 : 613, 627 (1937).
 (5) Tompsett., Bioch. J., 28 : 1536 (1934).
 (6) Linzel., Z. ges. exp. med., 86 : 269 (1933).
 (7) Heilmeyer & Plötner., Das Serum Eisen und die Eisenmangel krank-heiten. Jena. 1937.
 (8) Schade., Science 104: 340 (1946).
 (9) Roth & Finch: J. clin. invest. 28: 1 (1949).
 (10) Fowether., Bioch. J., 28: 4, 1160 (1934).
 (11) Roosen et al: klin. Wschr. 1540 (1930).
 (12) Hill., proc. Roy. Soc. London 167: 205 (1931).
 (13) Barkan., Z. physiol. chem., 216: 17 (1933)
 (14) Barkan & walker., J. Biol. chem. 135: 37 (1940).
 (15) 妹尾., 血, 學, 誌, 第1輯, 53 (1948).
 (16) Thoenes et al., J. clin. invest., 12: 967 (1933). c.f. Tompsett., Bioch. J. 28: 1539 (1934).
 (17) Lock., Z. physiol. chem. 216: 17 (1933).
 (18) 石上他: 血, 學, 誌, 13: 4, 316 (1950).

體 液 鐵 の 研 究 (第4報)

臓 器 内 非-hemin 鐵 の 測 定

Studies on iron in Body Fluid.

Microdetermination of non-hemin iron in tissues
with quinaldinic acid.

日本醫科大學營養學教室 (主任 島田敏夫教授)

吉 野 芳 夫*
Yoshino, Yoshio

臓器内の鐵はこれを 1) Hemin 系の物質と 2) non-Hemin 系鐵化合物に由來する鐵とに分類し得る⁽¹⁾。Hemin 系物質に就ては多くの詳細の研究があるが⁽²⁾, non-Hemin 系物質に就ては少く現今迄この類に含まれると考へられているものとして, Ferritin, ⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾, Hemosiderin⁽⁶⁾ 及特殊の不安定な鐵化合物⁽⁵⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾が擧げられるに止る。著者は著者等の教室から先に Quinaldine 酸試薬による全血及血清鐵の微量定量法⁽⁹⁾が發表されたが, 引續きこれが組織内 non-Hemin 鐵の測定法に應用する可く試み速に容易に施行し得る微量法を組立て得たのでここに報告する。

實 驗

前述の様に臓器内には Hemin 系と non-Hemin 系の鐵化合物があるが, この混在の状態か

ら如何にして non-Hemin 系鐵のみを撰擇的且定量的に抽出し得るか根本問題である。從來この問題に就ては數多くの方法が報告されてゐる。著者はこれらの抽出法を逐次注意深く追試してみた。その結果 Brückmann の提案した加温處理 Pyrophosphate 法⁽¹⁾の満足すべきものなるを知りその原理を應用して微量法に適合させて本法を考案したのである。

測 定 法

1) 試薬及び用具

- a) 飽和ピロ磷酸ソーダ溶液 (凡そ4%が飽和)
- b) 20% 3鹽素醋酸溶液 (化學用純品)
- c) Hydrosulfite-Na, $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ (化學用純品, 時に微量の鐵を認めることあり)
- d) 粉末硝子 (硬質硝子を粉細し鹽酸で洗滌乾

* 日本醫科大學營養學教室 本研究は主任島田教授に與へられた文研費の一部に負ふ。

燥させたもの)

e)肉厚硬質遠心沈澱管(内容15c.c.程度)

f)1% Quinaldine 酸曹達溶液

g)10% KCN 溶液

2)實 施 法

一定量の新鮮組織片(0.2~0.5g.)ag.を採り、粉末硝子を約0.2g.を混して硝子棒で挫細し更に Pyrophosphate 液を 2.0c.c.加へ充分攪拌後、20%3 鹽素醋酸 3.0c.c.を追加して混和する。錫箔にて覆ひ煮沸水中に 7 分間可及的正確に加温する。放冷後遠心分離(3000r.p.m. 15分)し、或は吸引濾過してその上清を使用する。通常は無色透明であるが時に僅かに黄色を呈することである。上清の一定量をmesscylinderに移しが 5 倍に稀釋しその 1.0c.c.を小試験管に採り、Na-hydrosulfite 粉末少量を加え鐵を總て還元し、Quinaldine 酸液 0.5c.c.を追加して發色させ更に KCN 溶液を 0.5c.c. Burette より注入すると増色する。10分後光電比色計により Filter 510m μ を通じてその E_x を求めて鐵量を算出する。

3)計 算 式

$$\frac{E_x - E_0}{0.0209} \cdot \frac{1}{a} \cdot \text{稀釋倍數} = x \text{ r/g}$$

但 E_x = 本試験値

E_0 = 盲試験値

附)還元劑は Hydroxylamine·HCl(H_2SO_4), phenylhydrazine· H_2SO_4 等でもよいが、これ等還元劑は時間と共にその能力が減退するので新製の手数を略するため $Na_2S_2O_4$ 粉末を使用した。 $Na_2S_2O_4$ 添加後放置すると白濁を生じることがあるが KCN 添加で10分以内に消失する、出来るだけ發色劑及び KCN 添加を次々と連續操作で行ふとこの心配はない。

係數 0.0209 は終末容積 2.0c.c. 槽の厚さ 10 mm Filter 510m μ の條件で 1r の鐵が示す E である。

測定法の吟味

イ) Pyrophosphate の Quinaldine 酸鐵反應に及ぼす影響

Tompsette に依ると Pyrophosphate は

Thiolacetic 酸と鐵の發色反應を抑制すると云ふ。著者の方法では使用された Pyrophosphate がその儘發色反應の medium に移されるのでこれの影響を是非検討しなければならない。一表はこれに関する實驗成績で、抽出時の濃度では 3 鹽素醋酸の共存下僅少の發色性の抑制が見られるが漸次濃度の稀釋に伴ひ抑制度が減少

Quinaldine 酸鐵反應に及す Pyrophosphate の影響

一 表

	既存鐵量 (γ)	溶液全量 (c.c.)	飽和ピロ燐酸-Na(c.c.)	20%3-鹽素醋酸	發見値 (γ)
1	20.0	5.0	2.5	3.0	19.4
2	"	"	1.5	その3/4	19.4
3	"	"	1.0	" 1/2	19.6
4	"	"	0.5	" 1/4	19.8
5	"	"	0	0	20.0

する。本法で實際に測定する場合の Pyrophosphate は抽出液を 4~5 倍に薄める關係上抑制率は發見値の 1% 内外で、この程度なれば誤差範圍となり問題になり得ない。

第一圖 檢 定 曲 線

ロ) Pyrophosphate-3 鹽素醋酸加 Quinaldine 鐵反應の檢定曲線

前報のそれと同一で極めて廣範圍に涉り Beer の法則に當嵌るのが知れる(一圖)。

ハ) 鐵抽出の時間的關係

著者は過去の諸抽出法を實驗的に比較検討した結果加温 Pyrophosphate-3 鹽素醋酸法を採用するのが適當であることを認めたので、この

第 二 圖

抽出法の時間的關係を知る可く次の二圖の様な實驗を試みた。材料として無菌的に處理した家兎肝臓を用ひ、對照として室温 Pyrophosphate 法を使ひ、その間得られる終末値と本法の測定値を比較する事とした。本法で抽出される鐵量は4分間で既に極値に達し、10分値で僅か上昇の氣味を認めるが、それ迄は殆んど變化しない。然も其値は室温法の3日間後の終末値とよく一致している事を認めた。

抽出法の検討

鹽酸處理法に就て：Starkenstein 並 Weden⁽¹⁰⁾等は抽出を鹽酸で行つてゐる。彼は實驗的經驗から鹽酸濃度を 5n としたがこの場合には臓器中に含まれる血液中的 Pseudohemoglobin 系(Barkan)の鐵が當然遊離され、それは微量であらうが、含血量の多寡で動搖することは覺悟しなければならない。初期は鹽酸抽出は臓器粉末を室温で行ひ抽出値が一定になる迄に3日間を要したので後加熱法に改めている。

Pyrophosphate 法に就て：鐵が Pyrophosphate と加熱されると酸に不溶性の鐵 Pyrophosphate 複合體が形成されると云ふが⁽¹¹⁾ Brückmann は鐵 Pyrophosphate anion $[\text{Fe}_2(\text{P}_2\text{O}_7)]^{4-}$ は水、酸によく溶けることを知り抽出法に應じた⁽¹⁾。この抽出時 medium が鹼性にならぬ事が必要で酸性にする意味と除蛋白操作

を兼ねて3鹽素醋酸を添加し加温處理して鐵の再現が100%である事を知つた。初期は室温で抽出したが3日間で漸く一定値に達するので時間短縮のため加温法に變更した。

還元剤による抽出法に就て：

Hill⁽¹²⁾ が鶏卵黃の鐵の研究から還元剤の投與で鐵が放出されるのを知り、Lintzel⁽¹³⁾、Heubner⁽¹⁴⁾等によつてこれら Fe^{3+} のみが Stable の蛋白結合體を造り、 Fe^{2+} に還元されると不安定となり鐵の遊離が起るのであらうと説明された。又 Tompsett⁽¹⁵⁾ は Fe^{2+} を

biological の物質に混和すると α, α' -Dipyridyl に反應せぬ様になるので Fe^{3+} は速に Fe^{3+} となり安定な物質を形成してしまふと考へ Fe^{2+} は結合體を造らぬと歸納した。又彼れは卵黃の他 Lecithin, Caseinogen, 卵白, Edestin, Gelatin 等を使用して結合狀態を研究し Thiolicetic 酸, Pyrophosphate-Na, Hydrosulphate-Na を添加すると直ちに還元と同時に鐵が遊離したと報告している。この根據の下に $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 單獨⁽¹⁶⁾、Hydroquinone 加 Diphridyl⁽¹⁷⁾ Thioglicolic acid. $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ⁽¹⁸⁾ 又は $\text{Na}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ⁽¹⁵⁾⁽¹³⁾ を用ひて遊離抽出する試がある。

此處で著者は當然これ等抽出法による測定値を比較すべきであるが但著者等の測定法を非-hemin 系鐵の總和を求めるに止らず更に該鐵成分を分割測定しやうと計畫している關係上還元剤による抽出法は適しないので漸く觸れぬ事とし鹽酸及 Pyrophosphate によるもののみに就き比較した(二表)。其結果は稍鹽酸

二 表
鹽酸抽出法と加温 Pyro. 3 鹽素醋酸
法との比較 (家兎肝)

鹽 酸 抽 出 法*	447 ± 21.4 γ/g
加温 pyrophosphate 法	459 ± 18.0 γ/g

* 5n-HCl. 7分間, 100°C (27)

法の値が上廻る様である。表中の数値は5本

同一組織についてのの平均値であるが各相互の實測値は鹽酸法の方が Pyrophosphate 法よりも僅ではあるが動搖する様である。この事實は Brückmann も指摘してゐる⁽¹⁾。次に Hemin 系鐵に對する抽出法の態度に關し考察が必要である。最も多量で且その含量が不定なものは臓器が含まれる血液である。その他の Hemin 系物質に就ては本法及鹽酸法共鐵出動に關して確實の實驗的根據を持たないので豫斷を許されぬが、只量的に比較的一定であり又微量であるので漸く置き目標を Hb に置いてこの問題に觸れてみた。三表に示される通り一定檢體に一定量の血液を混和し次で法に従ひ求値し、同時に加温鹽酸法を併用して對照として比較した。實驗の結果から推せば Hb に由來する鐵は殆んど抽出されないことが知れた。然しやはり鹽酸法が凡そ 4.2% 高値を示す。この理由は何處に由來するのであらうか。Barkan⁽¹⁹⁾の

三 表

臓器及血液量	抽 出 法	實 驗 値(γ)
肝 臓 0.4g	加温ピロ磷酸法	156±5.4
肝 臓 0.4g	加温ピロ磷酸法	156±6.0
血 液 0.25cc		
肝 臓 0.4g	加 温 鹽 酸 法	162.7 6
血 液 0.25cc		

易分離鐵にこの増加を結び付けて考へると、正常時該鐵量は 1.2~2.5mg%, 鹽酸の代りに同一濃度の硫酸を使用すれば 2.9~4.8mg%⁽²⁰⁾を示すから 0.25cc の添加血中には 3~12γ の鐵が含まれこれだけ對照に比して増量される理である。三表中の鹽酸法の値の増加はよくこの理論値に適合するが、しかし鹽酸法の増値と易分離鐵の關係については更に充分の検討を要する。又 Pyrophosphate 法でも單獨に血液を 7 分間 100°C で加温處理により 2mg%, 3 時間で 10mg% の鐵が出動するが⁽¹¹⁾、組織が共存すれば不思議の事にこの増量が認められなと言ふ。實際に著者の實驗でも同様の結果を得た。この事實は測定法の感度の誤差以内に入つてしまふか、或は何等かの理由にあるのかは不明である。何れにせよ結果的には Hemin 系

の物質は餘り影響がないと言へる。

二) 測定法の鋭敏度及添加實驗

四表は 同一家兔肝臓に就ての測定誤差の検討、五表は添加實驗である。添加實驗は +4.0—2.2% の誤差で添加鐵量は再發見される。臓器微量測定法として満足し得ると考える。

同一材料(家兔肝)に就ての測定誤差の検討

四 表

實驗例	E	鐵量 γ/g	誤差 %
1	0.152	353	+0.3
2	0.155	361	+2.6
3	0.151	349	-0.9
4	0.149	344	-2.3

添加實驗(家兔肝臓)

五 表

組織重量 (mg)	既存鐵量 (γ)	添加鐵量 (γ)	理論値 (γ)	發見値 (γ)	誤差 %
198	45.6	40	85.6	89.0	+4.0
202	46.5	40	86.5	84.6	-2.2
200	46.0	80	126.0	131.0	+4.0
198	45.0	80	125.0	128.0	+2.4

ホ) 他の測定法との比較

Barkan⁽²¹⁾ の O-Phenanthroline 法と比較した成績は六表に示される。極めてよく一致するのが知れた。

O-phenanthroline 法との比較

六 表

	O-phenanthroline 法 (γ/g)	Quinaldine 酸法 (γ/g)
腎 臓	77.3±0.6	78.0±0.5
肝 臓	292.0±3	304.0±9

各種臓器に就て得られた數値を纏めて掲げる(七表)。

各種動物臓器の鐵含有量

七 表

	家兔(γ/g)	馬 (γ/g)	牛(γ/g)	豚(γ/g)
肝臓	230~351	34.5	200	315
腎臓	69~93	49	49	54
脾臓	438~785	1012	615	269
小腸	52~93			
筋肉	41~44			

結 辭

1) 臓器鐵の抽出法に就き比較検討し、non-hemin 系鐵の定量的抽出は Brückmann の加温 Pyrophosphate-3 鹽素醋酸法が最も適して

いるのを識つた。

2) Quinaldine 酸による微量鐵測定法に上記抽出法を組合せて臓器内 non-Hemin 系鐵微量測定法を考案した。

3) 本法は操作容易で測定誤差が少く短時間に終了する微量法である。

拙筆に當り種々御注意を給つた日本醫科大學生化學教室上代教授に深謝する。

文 献

- (1) Brückmann et al., J. Biol. chem., 135: 23 (1940).
- (2) Nennat, Newyork Grune et Stratton (1949).
- (3) Laufberg, Bull. soc. chem. Biol., 19: 1575 (1937).
- (4) Michaelis, Advance in protein. chem., 3: 53 (1947).
- (5) Finch et al, Blood, 11: 183 (1950).
- (6) Cook, J. Biol. chem, 82: 595 (1929).
- (7) Greenberg, J. Biol. chem, 165: 397 (1946)
- (8) Darby, J. Am. med. Assoc, 142: 1287

(1950).

- (9) 山田政太郎, 日醫大誌, 19(3): 32 (1952).
- (10) Starkenstein u. weden: Arch. exp. path. u. pharma, 137: 274 (1928).
- (11) Borgen et al, J. Biol. chem, 119: 725 (1937).
- (12) Hill, Proc. Roy. Soc. London. Series B. 107: 205 (1931).
- (13) Lintzer, Ergebn. physiol., 31, 844 (1931).
- (14) Heuber, klin. Wschr., 5, 588 (1926).
- (15) Tompsett, Bioch. J, 28: 1902 (1934).
- (16) Starkleton, et al Bioch. J., 30: 582 (1936).
- (17) Kohler et al, J. Biol. chem., 113: 49 (1936).
- (18) Tompsett, Bioch. J., 29: 480 (1935).
- (19) Barkan, Z. physiol. chem., 171: 194 (1926).
- (20) Bodansky, Biochemistry of Disease, 40 (1940).
- (21) Barkan, J. Biol. chem., 135: 37 (1940).

偽ジフテリア菌及び乾燥症菌の栄養についての研究

Studies on the Nutrition of *Corynebacterium pseudodiphtheriae* and *C. xerosis*

日本醫科大學衛生學教室(主任 八田貞義教授指導)

研 究 生 渡 邊 次 雄

Watanabe Tsugio

Mueller 1 派の 10 年餘にわたる業績によつてジフテリア菌の栄養についての知識はほとんどあます所もないほどに充實したものとなつている。それは單に基礎的に細菌の生理化學に大きな力をあたえたばかりでなく, Mueller (1940)¹⁾ がその業績のしめくくりとして發表した毒素產生用の「再現できる培地」(reproducible medium)は實用的にもきわめて大きな恵みを細菌研究者にあたえている。

さてわれわれはこうして得られた知見の内容から, ジフテリア菌——ひいてはコリネバクテリウム屬全般の栄養からみた地位について考えてみなければならない。現代代謝研究の進歩はほとんどすべての病原細菌についてその發育素と窒素源, 炭素源の範圍を大まかながらつかむに足る材料を提供している。細菌全般から見て, 無芽胞グラム陽性桿菌の栄養要求は一般にかなりきびしい(exact)部屬に入る。すなわち