原 著

Ferritin の 結 晶 性 に 就 て

日本医科大学栄養学教室 (指導主任 島田敏夫教授)

銅 直 利 之

Toshiyuki Doobeta

(本論文の要旨は、昭和 27 年 11 月の第 69 回日本生化学会関東部会に於て報告した。)

緒 言

鉄代謝の研究には ferritin そのものの定量法が各方面から望まれている。最近此に答えて E. Tria, M.L. Arino, and G. Tecce,⁽¹⁾ 中島⁽²⁾, 米山—紺野⁽³⁾等及び Finch⁽⁴⁾ 等により種々の定量法が試みられ、又免疫化学的には Granick⁽⁵⁾, 木本—吉川⁽⁶⁾ 等の定量的沈降反応による方法の発表がある。然し未だ吾々を十分に満足させる迄には到っていない。この間にあつて半定量的に ferritin の存在を証明し得て鉄吸収機構の解明に決定的な役割をはたした Granick⁽⁷⁾ の所謂 semimicrochemical test なるものがある。これは ferritin を結晶として証明し、その数を求めるものであるから、最も確実であつて捨て難い長所を持っている。然しこの方法も ferritin の結晶化といふ操作が定量化には不安定の嫌があるので、著者は先づ ferritin の結晶性に就て検証し、改めて Granick の方法の信頼性を検討し、出来得ればこの結晶化による方法を組立て、定量への途を發展させようとした。茲にその試みた実験成績を述べる。

実 験

I Ferritin の結晶性に就て

検体として使用した ferritin は全て著者が Granick⁽⁸⁾ の報告に基き馬の脾臓から結晶純化させたものである。得られた Cd 塩結晶を硫酸に溶した後、蒸水に対し透析したものを使用した。その溶液 1.0 c.c. に 3.5 % HCl 0.5 c.c. を加へ 100°C, 10 分間加温後、20 % 3 塩素醋酸 0.5 c.c. を追加し暫く放置、次で遠沈、上清を適宜稀釈し chinaldin 酸法⁽⁹⁾ でその含鉄量を求め ferritin 量として取扱つた。

a) CdSO₄ 濃度と ferritin の結晶性

含鉄量 50, 200 γ /ml の純化 ferritin 溶液を検体とし夫々に CdSO₄ 1, 3, 5, 7, 10 % の最終濃度になるように添加して、その結晶化を観察した。結果は第 1 表の通りである。即ち 3~5 % では 24 時間室温に静止しておくとも、殆んど結晶はその管壁に全部附着して沈澱してしまふ。1 % 以下及び 7 % 以上になると溶液はひどく混濁し、同時に多くの沈澱物が生じて来る。これを顕微鏡下に観察すると、管壁に附着したものは共に定型的の ferritin Cd-塩結晶であるが、沈澱物は 1 % では結晶物は全く認めず、縁のくずれたやゝ大きな褐色板状物となり、7 % 以上の場合には極めて微細な非定型的結晶が僅少の定型的 ferritin 結晶の間に混在するのが認められた。

第 1 表 CdSO₄ 濃度と ferritin の結晶性との関係

Cd 濃度	外 観 鉄 量	混 濁	結晶生成	沈 澱	上清液の 鉄 含 量 (γ /ml)
1 (%)	200(γ /ml)	+++	—	+++	37.2
	50(")	+++	—	+++	28.8
3 (%)	200(")	—	+++	—	13.9
	50(")	—	+++	—	12.3
5 (%)	200(")	—	+++	—	13.9
	50(")	—	+++	—	11.2
7 (%)	200(")	++	++	+	11.2
	50(")	+	++	+	14.7
10 (%)	200(")	+	++	+	13.0
	50(")	+	++	+	11.2

この成績から ferritin の結晶化に適した CdSO_4 の濃度は 3~5 % であることを確認した。

b) 中性塩の影響

Cd -塩以外の例えば NaCl , KCl の様な中性塩を結晶化操作時に ferritin 溶液に添加しても高濃度でない限り余り影響は認められなかつた。勿論 ferritin は globulin 系蛋白結合体であるから、 NaCl の半飽和で混濁が起るが、実験はこの濃度以下の観察である。

c) pH の影響

ferritin は pH 4~10 の間で安定であると言ふが、その結晶化はやはり中性附近か、又は弱酸性がよい。然し pH 6 以下になると結晶性は落ちて来る。

d) ferritin の溶解度

上記の a) b) c) の条件に最も適した際の生成物を 3000 r.p.m. で 15 分間遠沈して完全に分離し、その際得た上清液について鉄量を測定してみると、第 1 表四列にある様に純化 ferritin の Cd -塩の溶解度は 11.2~13.9 γ/ml で、平均すると 12 γ/ml となる。この際 ferritin の Cd -塩結晶そのものの溶解性を見ると 11 γ/ml で、ferritin 溶液から結晶を析出させる場合よりも僅か溶解度の下廻るのが識れた。溶解性は pH 5.8 迄傾くと少し増すようであるが、誤差範囲の程度とも云へる。

II 組織内 Ferritin の結晶化に就て

上述の実験は要するに実際に組織内 ferritin を結晶させるための基礎実験であるが、この際組織の処理法が大きく影響するであらうことは当然予測される。依つて先づこの点に関して 2, 3 の考按を試みた。その実験法並に成績は次の通りである。

a) 凍結切片法

新鮮な組織を凡そ縦 10 mm, 横 5 mm, 厚さ 50 μ 位の凍結切片とし、それに 5~7~10 % CdSO_4 液数滴を加へ、覆硝子で封じ、湿室に 48 時間放置後鏡検、全結晶数を算定する考え方。

b) 組織かゆ法

Gramick⁽⁷⁾ が海馬の腸管粘膜中の ferritin を検出するに使用した方法を少しく変じたもので、新鮮の組織片に 1.5 倍量 (又は更にそれ以上の適宜倍量) の蒸水を加えて homogenizer で充分に粉細し、その一定量の粥を載物硝子上に採り、10 % CdSO_4 液を等量に添加混和後、凍結切片法の場合と同様の操作のもとに全結晶数を求めるもの。

c) 蒸水 80°C 温浸法

第 1 図に示す通り、80°C で組織を温浸し、その抽出

第 1 図 蒸水 80°C 温浸法

液に就て ferritin の結晶化をはかるものである。ちなみに三法とも顕微鏡の拡大は 5×40 とし、結晶の大きさは便宜上オクラール・メーターの目盛 (1 目盛は 4.4 μ) を基準とし、大, 中, 小 (大は 5 目盛以上, 中は 5 以下 3 目盛迄, 小は 3 目盛以下) に別し算定に便とする。

d) 以上の三組織処理法に就ての実験の結果、凍結切片法によるものは不満足で、馬の脾臓に小さな結晶が僅かに認められた他は、豚、牛の肝臓は勿論、脾臓及十二指腸粘膜にも全く認められなかつた。次に Granick の法及び著者の 80°C 温浸法では、結晶が著明に証明された。その一例を示すと、第 2 表の通りで、殊に蒸水 80°C 温浸法では、組織かゆ法のように組織片による視野の穢れがなく透明で、結晶型が明瞭であり、数の算定も容易なことが識れ、組織より結晶を見出すには最も優れていることが解つた。

第 2 表 組織粥法と 80°C 温浸法との比較

検体及 方法		結 晶 数 (0.1 cc)	結 晶 の 大 き さ		
			大	中	小
馬	脾 臓	粥 法	0	39	807
		温浸法	143	299	3679
	肝 臓	粥 法	0	0	21
		温浸法	0	3	32
	腎 臓	粥 法	0	0	0
		温浸法	0	0	0
	十二指腸 粘 膜	粥 法	0	0	0
		温浸法	0	0	0

豚	脾 臓	粥 法	0	32	264
		温浸法	0	0	2060
	肝 臓	粥 法	0	6	60
		温浸法	0	8	76
	腎 臓	粥 法	0	0	0
		温浸法	0	0	0
海 豚	十二指腸 粘 膜	粥 法	0	0	0
		温浸法	0	0	0
	肝 臓	粥 法	0	11	1935
		温浸法	0	36	4365
	腎 臓	粥 法	0	26	478
		温浸法	72	275	197

III 蒸水 80°C 温浸法の再検討

著者の 80°C 温浸法はその条件が全て純化 ferritin の結晶化の場合の成績をその儘転用したが、実際に組織に就て半定量的に取扱うためには更に条件を再吟味する必要がある。考慮される諸点に就て再び追ふことにした。

a) 放置温度並に時間の影響

検体組織として馬及び海豚の肝、脾臓の 80°C 温浸抽出液を作り、何れも 50 r/ml 含鉄量とし検体とする。これに上述の処理法を施した夫々二つの標本に就て ferritin 見出率を検べた。その結果は第3表に示す通り放置時間には余り影響が無いけれど、放置温度には影響を受けて、室温放置の方がむしろ優れている成績が得られた。

第3表 放置時間並に温度の影響
(50 r/ml 抽出液 0.01 cc)

組 織	時間 条件	24 時 間 後			48 時 間 後		
		大	中	小	大	中	小
馬 (脾)	室 温	14	3	3	15	2	3
	水 温	10	3	0	11	4	0
海豚 (肝)	室 温	2	240	569	2	225	607
	水 室	4	203	195	3	210	195

b) 添加 CdSO₄ 量の影響

基礎実験から CdSO₄ の終濃度は 5% が最も結果がよいのが知られているが、実際組織の場合でもこのことは正しい。例へば通常馬の ferritin より結晶が微細

第4表 CdSO₄ 濃度の浸出液中 Ferritin の
結晶化へ及ぼす影響

海 豚	臓 器	最 終 CdSO ₄ 濃度%	結晶数並に大きさ			結晶 総数	micell
			大	中	小		
肝 臓	I	15	0	0	0	0	+
		10	70	7	0	77	+
		5	150	678	420	1248	-
	II	15	0	0	0	0	+
		10	85	86	0	171	+
		5	202	895	452	1449	-
腸 粘 膜	I	15	0	0	236	236	+
		10	0	0	2164	2164	-
		5	0	0	2556	2556	-
	II	15	0	0	186	186	+
		10	0	0	1450	1450	-
		5	0	0	1860	1860	-
脾 臓	I	15	0	0	0	0	+
		10	0	0	0	0	+
		5	0	0	1320	1320	-
	II	15	0	0	0	0	+
		10	0	0	0	0	+
		5	0	0	1274	1274	-
腎 臓	I	15	0	0	942	942	+
		10	0	0	228	228	+
		5	0	0	3818	3818	-
	II	15	0	0	273	273	+
		10	0	0	258	258	+
		5	0	133	1183	1316	-

になり易い特徴を持つ海豚の各種臓器に就て CdSO₄ の終濃度を種々かへた際の所見を示すと第4表の通りで、勿論 5% の場合が最も検出率が高いが、10~15% になると、微細な ferritin 結晶は膨大化し、結晶縁は不鮮明となり且つ褐色の顆粒即ち micell が多く認められる様になった。この現象は馬の場合でも起り得るが、海豚程著明ではない。即ち海豚の ferritin の結晶化には CdSO₄ 濃度がより鋭敏に影響するのが識れた。

c) 80°C 温浸部の鉄量と結晶数との関係

80°C 温浸部の鉄量は結晶性 ferritin、非結晶性 ferritin 及び高級並低級分子鉄結合体に由来すると云われるが、それらの鉄量と結晶数、又は結晶後の上清中の鉄量との関係は、馬の脾臓の実験例をとれば第5

第5表 馬の脾臓抽出液含鉄量と結晶数

80°C 抽出液 (r/ml)	上清含鉄量 (r/ml)	結晶数/slide (0.01 c.c.)
150	36.6	254
100	26.4	59
75	22.4	35
50	17.6	18(20)
30	—	7
25	11.6	6(5)
23	—	4
20	8.4	2(3)
18	—	2
15	—	1

第2図 馬脾臓抽出液含鉄量と結晶数との関係

第6表 結晶見出の限界 (馬脾臓)

含鉄量 r/ml	30	25	20	18	15	13	12	10
結晶発見	+	+	+	+	+	+	—	—
I	+	+	+	+	+	+	—	—
II	+	+	+	+	+	—	—	—
III	+	+	+	+	+	+	—	—

表, 第2図及び第6表に纏め得られる。即ち, 抽出液の鉄量が 100 r/ml 程度迄は結晶数との間に大体相関が認められる。この際結晶化させる溶媒の容積は一定であり, ferritin の溶解率は第1表の実験から一定量に限定されている理であるのに, 第5表の抽出液含鉄量が増量するに伴ひ上清含鉄量の漸増を認めるのは, ferritin 以外の溶性含鉄物質の増加に因るものと解釈できる。次に最少結晶見出限界濃度をみると, 抽出液含鉄量 13 r/ml が限度であるのが知れた。この数は第

第7表 海馬の各種臓器抽出液含鉄量と結晶数との関係

海 馬	80°C抽出液含鉄量 (r/g)	検体含鉄量 (r/c.c.)	結晶の数並大きさ			全結晶数
			大	中	小	
肝 臓 (〇・〇一 c.c.)	I	720	20	0	28	2920
			30	0	72	4272
			40	0	156	4990
	II	1080	15	0	212	646
			20	2	292	716
			25	4	398	820
	III	420	15	0	99	1849
			20	0	235	3266
			25	0	280	5010
	IV	520	15	0	22	34
			20	70	287	191
	V	640	25	1	111	255
			25	0	33	76
小腸粘膜 (〇・〇〇八 c.c.)	I	45	16	0	0	26
			16	0	0	30
			20	0	5	74
			20	0	6	89
			24	0	22	150
			24	0	37	149
	II	30	16	0	0	157
	III	42	16	0	0	1114
			24	0	0	1950
腎 臓 (〇・〇〇八 c.c.)	I	80	20	0	55	999
			20	0	49	1241
			24	0	135	1803
			24	0	121	2093
			28	0	196	3174
			28	0	213	2960
	II	44	14	0	0	409
			16	0	12	516
			18	0	24	607
	III	100	16	0	92	409
			24	0	19	1568
			32	0	62	3194
	IV	100	24	0	113	1781
						1894

1表に示される 12 r/ml 前後の値とよく一致する。

扱てこの様に馬の脾臓, 肝臓抽出液の含鉄量と結晶

第3図 海猿の各種臓器抽出液含鉄量
と結晶数との関係

数との間には略相関が認められるから、組織内 ferritin 量を半定量的に知ることが出来る理である。こゝで対照動物を換へて海猿の各種臓器に就て同様の実験を試みた処、第7表、第3図に示す様に海猿の肝臓、脾臓及び小腸粘膜に於ては馬の場合と異り結晶数と濃度の間に相関々係を認め難く、同一条件でもその結晶型が或は大きく、小さく又は両者混在の割合がまちまちであつた。殊に脾臓ではその結晶化の条件が極めて不安定で、一個の ferritin 結晶さえも見出し得ない場合も稀には相遇した。この様な場合、油浸鏡検すると多くの場合微細な帯色の弱い特有の型の ferritin 結晶が多数発見される。然しこの結晶を算定することになると、半定量的とは云え仲々容易なことではなく、又その意義も疑しくなる。依つて著者は鏡検倍数を限定して半定量法を組立てやうと試みてゐるのでこの場合は論外とした。処が腎臓に於ては全くこれと相異して、濃度と結晶数との間に凡そ一定の相関が現われてくる。現在迄の処では、海猿を対照とする際には腎臓以外は

著者の目的には沿わない。この理解し難い事実は海猿の脾臓、肝臓の ferritin が馬のそれと本質的に相異するものか、或は結晶化への条件が海猿に於てはより複雑であるのか、全く不明である。こゝで実験を發展させて他の 2, 3 の動物について同様の実験を試みた結果、白鼠では組織 80°C 抽出液含鉄量が少い上に結晶化も困難であり、家兎に於ては、抽出液含鉄量は充分に有し乍らも、その結晶条件が非常にむづかしく、いづれも不満足であつた。以上動物の種類により、又は臓器の相異で、結晶化の操作が、定性的にはともかく、定量的には単一でないことが明らかとなつた。この原因は多種であらうけれど、先づ考えられることは溶性蛋白質による物理的影響である。含色素量を溶性蛋白質に因るものとしての比較及検体溶液の粘調度の比較実験等からは今迄の処この結晶性の難易を充分説明出来なかつた。

考 按

Ferritin そのものを結晶として定性的に検出証明しようとする試みは、ferritin の代謝を研究する手段として捨て難く、且つ有意義のものと考えられる。Gramick が組織粥を検体として ferritin を Cd-塩として結晶させてからその後特にこの方法を發展させた報告がない。著者はこの手段の正確度及び鋭敏度に就て再検討を試み、出来得れば半定量化を画した。この為には ferritin の溶解性という問題が差し当り解決の鍵であるから先づ検討した。

その結果純化 ferritin Cd-塩の溶解度は平均 10 γ/ml であるが、純 ferritin 溶液から CdSO₄ で析出沈澱させる場合の溶解度は少し高く 12 γ/ml となる。これは溶液から沈澱させる為に起る誤差であらう。組織に就て結晶見出限界濃度をみると、馬の脾臓の例では 13 γ/ml となるから ferritin 以外の鉄量が 1/2~1/3 温浸部に在つたと仮定しても略純化 ferritin の溶解度に近づく。一方 ferritin の結晶化は色々の条件によつて左右され、殊に添加 CdSO₄ の濃度が大切で、3~5 % を最適とし、10 % 以上になると結晶性が悪くなり、無定形の沈澱物となる。これは CdSO₄ の蛋白質沈澱性に因るものであらう。pH も中性附近がよく、中性塩も濃度が高くなると悪くなる。これらの条件は実際に組織から ferritin を結晶させる場合にも当嵌る。結晶析出と温度との関係は純化 ferritin の場合には区別を認め難いが浸出液よりの場合は氷室よりも常温放置の方がよい。これ等の基礎実験の後 Granick の提案になる所謂 semimicromethod に就て組織を検体

として再検討した。凍結切片法は定性的にも ferritin 検出率が極めて悪かった。それは細胞内に拡散性に存在する ferritin を一度溶出させて後に Cd-塩を作用させた方が結晶し易い理で、凍結切片法では溶出前に CdSO₄ が作用して細胞そのものが凝固してしまうためと考えられる。臓器を蒸水で 80°C 温浸した液から Cd-塩として結晶させる著者の方法は Granick の溺法よりも遙かに優れていることを識つたのでこれが ferritin 量の半定量法的手段として用ひられようかどうかをみた。純化 ferritin では十分に目的が達せられたが、組織の場合には簡単でなく動物の種類により或は臓器によつて異なるのを識つた。例へば、馬の場合には充分応用出来るが、然し海馬では腎臓を除き肝、脾臓及び十二指腸粘膜とも析出結晶数と抽出液含鉄量との間に定量的な相関は認められなかつた。一般に結晶を溶媒から、殊に体液より析出させる条件はさう簡単なものでないし且 ferritin は動物の種類でその結晶型が異なると云う報告もあるから、この相違を ferritin 自身に原因を求めるか、又結晶沈澱化の条件の不適當になすかは、多角的の解析実験が必要である。この諸因子の内、殊に保護膠質となり易い温浸部の蛋白含有量との関係を不完全の実験ではあつたが追つてみたが、その結果は取り立てる程の所見を得ることは出来なかつた。将来更に各種動物に就き詳細に因子を究めて把握出来れば、結晶算定法による ferritin の半定量法は ferritin 代謝のより好ましい標尺としてもちひられるものと信ずる。

結 論

- 1) 馬の純化 ferritin を使用してその溶解性を検

し、ferritin の Cd-塩は 15~20°C で 11 γ/ml の溶解度をもつ。

- 2) 純化 ferritin は一定の条件で CdSO₄ に依つて定量的関係のもとに沈澱する。

- 3) 結晶沈澱法による ferritin の証明法を組織に就て比較研究した結果、著者の蒸水 80°C 温浸、5% CdSO₄ 添加、室温 48 時間放置法が最も良いのを識つた。そしてこの方法は ferritin の証明法としては Granick の方法に数段勝るものである。

- 4) ferritin 結晶を算定して既存結晶性 ferritin を定量する方法は動物の種類により、又同一動物でも組織の種類により ferritin の結晶析出条件が相違するので簡単には達せられない。

稿を終るに臨み終始御懇篤なる御指導と御校閲の労を賜りたる恩師島田教授に深甚なる感謝の意を捧げ、尚種々御助言を頂いた吉野、中島両学士に心から感謝します。

文 献

- 1) E. Tria, M.L. Arino, and G. Tecce : Chem. Abst. **41**, 494. (1947) ; Bull. Soc. Ital. Biol. Sper., **22**, 350-2 (1946)
- 2) 中島 : 日医大誌., **19**, 8 (1952)
- 3) 米山・紺野等 : 生化学会総会発表 (1952.4)
- 4) C.A. Finch : Blood, **5**, 983 (1950)
- 5) S. Granick : J. Biol. Chem., **149**, 157 (1943)
- 6) 木本・吉川等 : 綜合医学. **9**, 20 (1952)
- 7) S. Granick : J. Biol. Chem., **164**, 737 (1946)
- 8) S. Granick : J. Biol. Chem., **146**, 451 (1942)
- 9) 吉野 : 日医大誌. **19**, 395 (1952)