血清鉄の研究殊に総鉄結合能について (I)

(総鉄結合能の微量測定法)

日本医科大学栄養学教室 (主任 島田敏夫教授)

斎 藤 達

Susumu Saito

緒 言

正常血清中の鉄のすべては β_1 metal-combining-protein, siderophilin¹⁾ と結合して存在する²⁾。此の蛋白質の物理的性状³⁾ については詳細に研究され、更に siderophilin 量は血清蛋白質の約 3% を占めること、鉄との affinity が強くこの蛋白 1 分子は 2 分子の鉄と結合すること、又正常人に於ては此の約 30% が鉄と結合し残り 70% は鉄と結合していない遊離の状態存在して居ること等が明らかにされている。

この遊離部分は勿論鉄と強い affinity を持ち鉄の吸収、鉄の臓器組織間の移動に大きな役割を持つものと考えられている⁴⁾。

通常この血清の鉄と結合出来る能力即ち siderophilin の全量は総鉄結合能 Total-iron-binding-capacity (以下 TIBC と略記) と呼ばれ、鉄代謝研究上興味ある研究対象となつて来た。

例えば鉄欠乏性貧血では血清鉄の低下と共に TIBC の上昇を⁵⁾、伝染性疾患では血清鉄及び TIBC の低下を⁶⁾、悪性貧血では血清鉄及び TIBC の増加を⁵⁾、或は hemochromatosis^{5), 7)} では TIBC が鉄で飽和しつくされる等その変動は臨床診断的にも価値があると報告されている。

この TIBC の測定法は現在迄各種の方法が発表されているが、これらを原理的にみると

1) Direct iron addition colorimetric method

2) Indirect iron saturation excess method

の 2 者に分れる。

1) の代表的なものとしては Rath⁸⁾ の所謂 plotting method がある。これは血清の鉄結合性蛋白質は鉄と結合すると鮭肉紅色となるので、鉄を添加してゆきこの発色が一定以上増強しなくなった点を求め、それ迄に加えた鉄量を別途測定した血清鉄量に加えて求めるものである。

2) に属するものとしては Laurell⁹⁾ らの法がある。これは血清に多量の鉄を加え siderophilin に結合させ充分飽和せしめた後、余剰の遊離鉄量を発色して求め、添加鉄量から差引いて TIBC を誘知する方法である。

しかし乍ら何れの方法も多量の血清を要する難点を有し、小動物の実験に於ても採血量が甚だ多量となるので (実施が) 制約される面があつた。更に plotting method はその終反応が判然としないこと、乳糜血清或は鉄添加につれて血清の濁度が異常に変化する場合などでは測定不能であること等の難点がある。又 Laurell 法には差を求める点、試薬の入手困難などの短所が存在する。

2) の原理にのつとり鉄を過剰に加えた後、余剰の鉄を発色法によらずに除外出来れば、容易に TIBC の測定が出来る理である。Peters はこの原理に基き Amberlite IRA 410 resin を用いて測定する方法に成功した¹⁰⁾。

著者はこれ等各種の測定法を吟味した結果 Peters の方法が前述の諸法よりも優越性を有することを認識した。しかし乍ら此の方法とても最低血清 1.0 ml を要するので小動物には利用し得ない。そこで著者は先に教室野田が発表した鉄微量発色試薬 Nitroso-R 塩¹¹⁾ を用い、更に測定法そのものについても、若干の検討を加え、血清 0.5 ml で誤差の少い新微量法を組立て得たので報告する。

実 験 篇

微量法を組立てるに当り次の 2 つの事項について実験した。

I) 準備実験

- a. 試 薬
- b. 使用 buffer の量的関係
- c. 測定法の組立

- d. 検量曲線
e. Peters 原法との比較

II) 微量測定法の検討

- a. citrate ion の影響
b. 時間的推移
c. 負荷条件時の測定

I) 準備実験

- a) 試 薬

1. クエン酸鉄アンモン 50 r/ml 溶液

市販のクエン酸鉄アンモン (FAC) は若干の水酸化鉄が含まれているのでこれを使用することはよくない。次の様にして作製したものを使用した。

適量の塩化第2鉄溶液 (約 3 g を溜水 200 ml に溶解する) に 28% アンモニア水少量を入れ攪拌し暫時放置の後遠心沈澱する。上清を捨てた後沈査に少量の水と少量のクエン酸結晶を加え、加温しながら溶解する。自然冷却を待つて濾過し、濾液を溜水にて3~4倍に稀釈後希アンモニア水 (3~5%) で pH 6.5~7.0 に補正したものを原液とする。これより更に稀釈して 50 r/ml の鉄液を作る。冷蔵庫内に保存すると約3ヶ月間は使用に耐える。

2. バルビタール緩衝液

NaCl 6.4 g ギエチルバルビツール酸 6 g ギエチルバルビツール酸ナトリウム 2.3 g を水 1,000 ml に溶解した後塩酸で pH 7.5 に補正する。

3. Amberlite IRA 410 resin

約 3n. 塩酸に 24 時間浸して鉄分を完全に溶解除去させた後、蒸留水で十分に洗滌し更に上述の緩衝液を通し pH 7.5 に補正する。これを 95°C で乾燥してから保存する。

4. 2% 塩酸溶液
 5. 30% 三塩化酢酸溶液
 6. 1% Nitroso-R 塩水溶液 (Nitroso-R 塩は市販のものを 2~3 回水より再結晶した)
 7. 10% 塩酸ヒドロオキシルアミン溶液
 8. 7~10% NaOH 液
 9. 4M の pH 6.1 酢酸-酢酸ソーダ緩衝液
- 但し器具はクロム硫酸を通して清浄にしたものを用い使用蒸留水は再蒸留水を用いる。

b) 使用 buffer の量的関係

Peters の原法では血清 1.0 ml に buffer 5.0 ml を加えるので血清が大きく稀釈される。微量化に当り、この点につき検討を加え buffer 及び血清量を変えてみた所次の様な結果になった。

第1表 血清と添加 buffer の量的関係

原 法	変 法 I	変 法 II
血 清 1.0 ml buffer 5.0 ml	血 清 1.0 ml buffer 2.0 ml	血 清 0.5 ml buffer 1.0 ml
646	651	643
710	725	721
932	875	890
515	494	494
890	825	883

第1表の如く原法に対し微量化した血清 0.5 ml buffer 1.0 ml 条件の場合も、血清 1.0 ml buffer 2.0 ml の場合も共に好結果を得た。そこで変法IIを骨子として測定法を組立てた。

c) 微量測定法の組立及び操作法

第2表の如き組立てを試みた。その操作方法を述べると次の通りで本実験及び対照実験の2つに分かれる。

(1) 本実験

血清 0.5 ml を小試験管にとり、クエン酸鉄アンモン溶液 0.05 ml (2.5 r 鉄) を加え、混和してから 37.5°C フ卵器内に約 10 分間放置する。次いで放冷後乾燥した resin 0.2 ml を加え時々混和しながら 5~10 分間置く。次に pH 7.5 バルビタール緩衝液 1.0 ml を加え約 10 分間できるだけ泡を立てない様に攪拌を続けた後軽く遠沈して上清を分離する。此の上清 1.0 ml に 2% 塩酸 0.25 ml を加え 37.5°C フ卵器に 3 時間放置する。これに 30% 3 塩化酢酸 0.25 ml を加え混和、30 分放置後 3,000 回転 15 分間遠沈する。

この上清 1.0 ml に 7% NaOH 0.25 ml, 4M pH 6.1 の酢酸-酢酸ソーダ緩衝液 1.0 ml を加え更に 1% Nitroso-R 塩と 10% 塩酸ヒドロオキシルアミン溶液を同量宛混合したもの 0.25 ml を加えよく混和振盪すると呈色するから直後から 48 時間以内に filter 720 $m\mu$ 液槽 10 mm の cell を用い光電比色計を使って吸光度 $E_{(x)}$ を求める。

(2) 対照実験

実験 (1) の対照として血清の代りに水 0.5 ml を用い実験 (1) と全く同様に操作し $E_{(o)}$ を求める。

この際 resin が完全にイオン交換の機能を發揮すれば、この対照からは鉄を検出し得ない理である。若し検出する時は resin の作成が不適当なものを使用した場合であるから resin を新たに作り直す必要がある。

第2表 Peters の変法

計 算

$$\frac{E_{(x)} - E_{(0)}}{K} \times \frac{3}{2} \times \frac{3}{2} \times 2 \times 100 = \text{総鉄結合能 } r\%$$

ただし K = Nitroso-R 塩の発色による $1r$ の鉄の吸光度

$$\frac{3}{2} \times \frac{3}{2} : \text{希釈倍数}$$

2 : 0.5 ml を 1.0 ml の割にするための倍数

d) 検量曲線

上述の操作方法で検量曲線を作ってみると第1図の

第1図 検 量 曲 線

様になる。

e) Peters 原法との比較

以上の方法を用いて同一血清に就て Peters 原法と比較測定した結果は次の様であつた。

第3表 Peters 原法と改良法との比較 (単位 $r\%$)

例	Peters 原 法	改 良 法
1	$\left. \begin{matrix} 683 \\ 646 \\ 667 \end{matrix} \right\} 665$ $-2.8\% \sim +2.8\%$	$\left. \begin{matrix} 643 \\ 621 \\ 655 \end{matrix} \right\} 640$ $-2.9\% \sim +2.4\%$
2	$\left. \begin{matrix} 710 \\ 710 \end{matrix} \right\} 710$ ± 0	$\left. \begin{matrix} 721 \\ 692 \end{matrix} \right\} 707$ $\pm 2.06\%$
3	$\left. \begin{matrix} 895 \\ 932 \\ 915 \\ 895 \end{matrix} \right\} 909$ $-1.54\% \sim +2.53\%$	$\left. \begin{matrix} 890 \\ 890 \\ 932 \\ 960 \end{matrix} \right\} 918$ $-3.3\% \sim +4.5\%$
4	$\left. \begin{matrix} 514 \\ 550 \\ 498 \\ 498 \end{matrix} \right\} 515$ $-3.3\% \sim +6.8\%$	$\left. \begin{matrix} 515 \\ 494 \\ 473 \end{matrix} \right\} 494$ $\pm 4.25\%$
5	$\left. \begin{matrix} 932 \\ 975 \\ 954 \\ 932 \end{matrix} \right\} 948$ $-1.7\% \sim +2.8\%$	$\left. \begin{matrix} 942 \\ 976 \\ 960 \\ 942 \end{matrix} \right\} 955$ $-1.3\% \sim +2.2\%$
6	$\left. \begin{matrix} 911 \\ 890 \\ 874 \end{matrix} \right\} 892$ $-2.0\% \sim +2.1\%$	$\left. \begin{matrix} 883 \\ 883 \\ 904 \end{matrix} \right\} 890$ $-0.8\% \sim +1.5\%$

希釈倍数を変化させ Nitroso-R 塩を用いて微量化しても Peters の原法と極めてよく一致することを知つた。

II) 測定法の検討

a) citrate ion の影響

Schade らも云う如く siderophilin と鉄との結合は citrate ion によつて促進されると同時に、逆に解離も citrate ion によつて促進される。若しも citrate ion が多いと高 pH の medium でさえも鉄が遊離すると報告されている。これは従来法でも注意せねばならぬ点であるが、この微量法では尚更問題となる。そこで過剰の citrate ion について検討を行つた。結果は第4表の通りである。

2.5 r のクエン酸鉄アンモン中には最低 25 r の citrate ion が含まれるがこれが 35 r 以上入つた場合を示した。正確に 25 r 入つた場合に対し 35 r から 45 r 入つた時は大差はないが 75 r 以上入ると得られる値は大きく降る様である。buffer は本定量法では常に 1.0 ml 添加してある。表では 75 r 迄は余

第4表 Citrate ion の検討 (単位 $\gamma\%$)

Citrate 量	buffer 2.0 ml		buffer 1.0 ml	
	例 I	例 II	例 I	例 II
25 γ ($8 \times 10^{-3} M$)	540	473	339	340
35 γ	528	462	329	336
45 γ	525	477	326	336
75 γ	526	450		342
125 γ	451	431		294

り変化がない。この故に添加すべき鉄の作製は前述の如く慎重であらねばならない。

b) 時間的推移

採血後室温で約1時間放置して後遠沈分離、血清を採取したものを氷室内に保存した時 TIBC がどの様に変化するのかについて検討した。成績は第5表の様である。

第5表 TIBC の時間的变化 (単位 $\gamma\%$)

	採血直後	24時間後	48時間後	72時間後	96時間後
1	376	402	413	413	428
2	464	492	498	486	
3	665	677	674	697	

表の如く時間の経過と共に増加の傾向にあり24時間値で既に上昇していた。これは蛋白変性の結果と思われるが、これからみて測定には常に新鮮血清を使用すべきである。

c) 条件負荷時の TIBC

TIBC が変動した時の微量法の応用例として条件負荷時に求めた成績は次の通りである。

i) 瀉血による TIBC の変化

瀉血貧血家兎の測定結果は第6表の如くである。

第6表 瀉血による TIBC の変化

		血清鉄 $\gamma\%$	TIBC $\gamma\%$	不飽和度 $\gamma\%$
1	瀉血前	185	445	260
	70 ml 瀉血後	123	540	417
2	瀉血前	218	680	462
	70 ml 瀉血後	178	889	711
3	瀉血前	215	583	368
	30 ml 瀉血後	201	508	307
	50 ml 瀉血後	148	620	472
4	瀉血前 Hb 90%	201	518	317
	瀉血後 Hb 75%	185	590	405
	" 60%	169	630	461

血清鉄の減少、TIBC の増大、不飽和度の増加等従来の報告とよく一致していると思われる。

ii) 低蛋白血症の TIBC

低蛋白血症は2kgの家兎を約50ml耳静脈より凝固防止液を入れた注射筒で採血し、有形成分のみを食塩水浮遊液として耳静脈へ注入して低蛋白血症動物をつくつた。この際の TIBC の変化を示すと第7表のようになる。

第7表 低蛋白血症の TIBC

日	I		II		III	
	血清鉄 $\gamma\%$	TIBC $\gamma\%$	血清鉄 $\gamma\%$	TIBC $\gamma\%$	血清鉄 $\gamma\%$	TIBC $\gamma\%$
前	152	510	180	386	220	418
1	131	456	247	545	148	413
3	110	381	131	540	109	487
5	320	604	155	524	120	471
7	180	614	480	698	203	498
12	371	522	131	476	100	508

TIBC の変化をみると第I例では3日目迄下降、5日目に上昇し7日目を頂点として12日目に向つて下降した。第II例では第1日で既に上昇したが7日目を山として以下下降し、第III例では1日目下降以下動揺しながら7日目に稍上昇し12日目迄は著変しない。

何れによせ一時 TIBC の増加が起ることは興味がある。

総括並びに考按

TIBC は血清鉄の変動と相対つて種々の病的変化に特有な変化を示し^{5), 6), 7)}、その測定は疾病診断に役立つことが明らかになつたので近年注目されて来た。その測定法も種々改良されて来ているがそれぞれ長所短所を持ち、一般研究者を充分満足させるものがない様である。初期に発表されその後も屢々応用されて来た所謂 plotting method は著者の追試実験によれば、原理的には極めて十分であるがその実施上に難点があり、到底満足な結果が得られないことを知つた。Peters が resin による鉄吸着除去を応用して考案した方法¹⁰⁾は操作法の簡単、鋭敏度の上からも極めて優秀で近時はこの分野の研究に広く利用されている。たゞ本法で問題になる点は使用血清が最低1.0mlを必要とする為、通常実験室で好用する小動物には、殊に遂時間的にその変動を追究する様な場合には不可能に近い。従つてこの方面の研究分野ではより一層微量法が要求されていた。そのためには鉄発色試薬のより鋭敏なものの出現が期待された理である。共同研究者野田は o-phenanthroline や dipyrldyl よりも3倍程度

鋭敏度の高い Nitroso-R 塩¹¹⁾ を使用して初めて血清鉄の微量測定法を発表した。それに続いて血清鉄結合能の微量測定法も考案して小動物研究に貢献した¹²⁾。その原理は血清に過剰の鉄を添加し siderophilin を飽和せしめた後 siderophilin と結合しなかつた鉄量を発色により求め、これを添加鉄量から差引いて不飽和度を求める方法であるが、その実験操作法に稍複雑の嫌いがあつた。そこで著者は resin を使用し過剰遊離鉄を定量的に除去する Peters の考え方もまた捨て難い点があるので、野田の Nitroso-R 塩と組合せてより操作の容易な微量法の組立を試みた理である。

測定法は衆知の様に与えられた条件を厳密に守るべきもので仮りにその量的条件をみだりに変更すべきものではない。著者は resin 法を更に微量法に改めるためにはこの点を充分検討する必要があるものと考え、添加すべき鉄量に対する resin 量の割合、更に反応 medium となる buffer の量についても厳密に検討して満足する条件を決定した次第である。又本法に於ては過剰添加鉄剤はクエン酸鉄アンモンを使用するが、市販のものは屢々一部分解して水酸化鉄を含有することがあるため測定誤差を招く点を指摘し、添加用鉄錯塩の自家調製をすすめた。又過剰の citrate ion によつて transferrin 鉄は解離が促進される為、極微量法に於ては特に注意せねばならない¹⁰⁾。そこでその影響の度ををしらべるために各種の濃度の citrate ion 混在時について結合能を測定し citrate ion が 75 γ /0.05ml迄混存しても著者の方法によれば誤差は極めて僅少であることを知つた。

その他の測定条件についても吟味した結果、測定は血清採取後可及的速に行ふべきで 24 時間氷室保存でも尚測定値の多少の増加を招くことを知つた。これ

は恐らく蛋白体の変性によるものと考えられる。

瀉血家兎及び血清蛋白喪失の際に TIBC が一過性に増加を認めることは siderophilin と臓器蛋白体殊に apoferritin との移行を推定して居る Braunsteiner¹³⁾ の報告と併せ考えると極めて興味深いものと云える。

結 論

1. Peters 法を基として Nitroso-R 塩を発色試薬として微量総鉄結合能測定法を考案した。

2. 本法は使用血清量 0.5 ml で測定可能である。従つて小動物の測定、又遂時時間的追跡実験に適している。

3. Peters 法との測定比較によるとよく一致し満足すべき結果を得た。

文 献

- 1) R. Strässle : Experimentia, **9**, 243 (1953)
- 2) W. Horst, K.H. Schäfer : Klin. Wochschr., **32**, 961 (1953)
- 3) C.E. Rath and C.A. Finch : J. Clin. Invest., **28**, 79 (1949)
B.V. Jagar : J. Clin. Invest., **28**, 792 (1949)
H. Braunsteiner : Klin. Wochschr., **30**, 394(1952)
C.E. Rath et al. : J. Clin. Invest., **28**, 38 (1949)
- 4) A.L. Schade and Carolin : Science, **104**, 340(1946)
A.L. Schade et al. : Arch. Biochem., **20**, 170(1949)
- 5) C.E. Finch et al. : J. Klin. Invest., **28**, 38(1949)
野田真男 : 生化学誌, **30** (4), 55 (1958)
- 6) P. Brendstrup : Acta Med. Scand., **145**, 315(1953)
- 7) J.C. Houston et al. : Quart J. Med., **21**, 215(1952)
- 8) C.E. Rath et al. : Clin. Invest., **28**, 38 (1949)
- 9) Holmberg u. Laurell : Acta Physiol. Scand., **10**, 307 (1952)
- 10) T. Peters et al. : J. Klin. Med., **48**, No.2 (1956)
- 11) 野田真男 : 生化学誌, **29**, (3), 199 (1957)
- 12) 野田真男 : 生化学誌, **30**, (4), 52 (1958)
- 13) H. Braunsteiner : Klin. Wochschr., **30**, 394(1952)

血清鉄の研究殊に総鉄結合能について (II)

(Hormone その他の総鉄結合能に及ぼす影響について)

日本医科大学栄養学教室 (主任 島田敏夫教授)

斎 藤 達
Susumu Saito

緒 論

血清鉄の変動機序に関しては、一般には脳下垂体—副腎皮質—網内系の関連性に立脚して説明が試みられ

ている¹⁾。これは ACTH, cortisone の投与によつて著しい血清鉄の下降が起る^{2), 3)} 事実によつて裏づけられる。しかし乍ら副腎を剔出すると、かえつて術後³

日目で血清鉄の減少が起る⁴⁾。又この低血清鉄症は少量の cortisone の投与で剔出前の値に戻るなどの paradox があり現在なお多くの疑問がある。この点に関し共同研究者山口は臓器 2 価鉄蛋白体と血清鉄の関係、高血糖と血清鉄との関係等を明らかにしている。しかし乍らこれ等の場合の総鉄結合能 Totaliron-binding-capacity (以下 TIBC と略記する) の変化については現在迄あまりはつきりした報告がない。その理由の一つに TIBC の測定法が複雑で且測定材料を比較的多量に必要とする為にその実施に煩わしさを感じた点もある。幸いに著者は I 報に述べた様に微量測定法を組立て得たのでその応用としてこれ等の点を明らかにすべく、副腎系 hormone その他を用いて実験を行い、いささかの成績を得たので報告する。

実験方法

1) 実験動物 使用動物は白ネズミ及び家兎を当て白ネズミは体重 120 g $\pm$ 8 g の雄性のもの、家兎は 2 kg 前後の雄を用いた。

2) 血清鉄の測定は野田の法⁵⁾を用いた。血清 0.5 ml に 0.8% 塩酸 0.5 ml 加え 37°C 3 時間フ卵器内に置き、これに 15% トリクロール酢酸 0.5 ml を加え混和し 30 分間放置後 3,000 回転 15 分間遠心沈澱して除蛋白する、その上清 1.0 ml に 0.5% Nitroso-R 塩 0.25 ml, 5% 塩酸ハイドロオキシルアミン 0.25 ml を加え更に 0.73 n アンモニア水 0.5 ml, 4 M 酢酸-酢酸ソーダ緩衝液 pH 6.1 を 0.5 ml 加え 15 分後 filter 720 m μ , 厚さ 10 mm の cuvet で比色測定し、得られた Extinction に系数を乗じて鉄量を得る。(著者の場合は 0.140 であつた)。

3) 総鉄結合能 (TIBC) の測定は著者が微量化した Peters の変法⁶⁾を用いた。これの大略を記すと血清 0.5 ml に 50 r/ml のクエン酸鉄アンモン 0.05 ml 加え 10 分間 37.5°C フ卵器に入れた後 Amberlite IRA 410 resin pH 7.5 を約 0.2 ml 加え 5 分間軽く混和し、更にのバルビタール buffer 1.0 ml 加え約 10 分間混和する。此の際出来るだけ泡を立てぬ様にす。軽く遠沈して上清 1.0 ml を採りこれに 2% 塩酸 0.25 ml 加え 37.5°C 3 時間以上フ卵器内に放置する。次に 30% 3 塩化酢酸 0.25 ml 加え混和、30 分間除蛋白後 3,000 回転 15 分間遠沈し上清 1.0 ml を分離する。これに 1% Nitroso-R 塩と 10% 塩酸 hydroxylamine の等量混合液 0.25 ml を加えた後 7% の NaOH 0.25 ml 加え更に pH 6.1 4 M 酢酸 buffer 1.0 ml を追加し、15 分後に filter 720 m μ 厚さ 10 mm

の cuvet で比色測定する。得られた Extinction は $\frac{E(x)-E(o)}{K} \times \frac{9}{4} \times 2 \times 100$ の式により鉄量に換算した。但 E_o は対照値。

実験成績

1) 正常白ネズミ及び正常家兎の血清鉄と TIBC について

a) 白ネズミの場合

1 群 5 匹, 10 群の平均値は第 1 表の通りである。

第 1 表 正常白ネズミの血清鉄及び TIBC

群	血清鉄 r%	TIBC r%	不飽和度 r%	coefficient
1	138	494	356	
2	184	558	374	
3	148	552	404	
4	173	776	603	
5	155	614	459	
6	187	508	321	
7	187	550	363	
8	205	614	409	
9	233	572	339	
10	177	693	516	
平均	178.7	593.1	414.4	3.32

血清鉄値は 178.7 r% で従来得られたものとよく一致する。これに対し TIBC は 593.1 r%, 不飽和度は 414.4 r% で relative coefficient (TIBC/血清鉄) は平均 3.3 であつた。

b) 家兎の場合

約 2 kg の雄家兎 9 例の血清鉄値, TIBC は第 2 表の通りである。

第 2 表 正常家兎の血清鉄と TIBC

例	血清鉄 r%	TIBC r%	不飽和度 r%	coefficient
1	202	515	313	
2	304	445	141	
3	131	678	547	
4	314	466	152	
5	286	476	190	
6	155	456	301	
7	145	540	395	
8	138	487	349	
9	201	530	329	
平均	208.4	510.3	301.9	2.45

平均血清鉄値は 208.4 r%, TIBC 510.3 r%, 不飽和度は 301.9 r% で coefficient は 2.45 であつた。

2) 副腎剔出の影響

副腎剔出実験は白ネズミのみにについて行い、剔出手

術後 4 日目に採血測定した。成績は第 3 表に示した。

第 3 表 副腎剔出の影響 (白ネズミ)

群	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
1	103	290	187	
2	140	374	234	
3	212	466	254	
4	148	360	212	
5	148	360	212	
平均	150.2	370.0	219.8	2.46
正常	178.7	593.1	414.4	3.32

正常値に比較して剔出群は血清鉄が下降する。その割合は 15.9% であった。この事実は従来報告とよく一致している。この際の TIBC は正常に比し著明な下降を示した。その下降率は 37.6% となる。不飽和度は 219.8% で 46.9% の減少をみた。従つて coefficient は 2.46 と変化した。この様に副腎剔出個体では血清鉄の減少度より TIBC の減少度の方が大きい。

3) Adrenaline の影響

a) 正常白ネズミの場合

第 5 表 正常家兎に対する adrenaline 投与時の血清鉄と TIBC

分	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
前	275	459	184	1.67	264	402	138	1.52
15	272	424	152	1.56	275	367	92	1.33
30	377	480	103	1.27	335	420	85	1.25
60	314	424	110	1.35	225	388	163	1.72

第 5 表に示した通り血清鉄は 15 分値では注射前と大した変化はないが 30 分では上昇し 60 分では再び下降している。TIBC は 15 分で稍減少、30 分で増加し 60 分では再び減少して居り、不飽和度は注射前より 30 分にかけて漸減し 60 分では再び増加している。何れにせよ血清鉄、TIBC は 30 分に於て最高値を、不飽和度は 30 分で最低値を示した。

c) 副腎剔出白ネズミに adrenaline を投与した場合

副腎剔出白ネズミに 0.1 mg の塩化 adrenaline を皮下注射して 60 分後に採血測定した。成績は第 6 表

第 6 表 副腎剔出白ネズミに対する adrenaline 投与時の血清鉄と TIBC

	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
副腎剔出 + adrenaline 注	174.6	431.1	256.5	2.46
副腎剔出	150.2	370.0	219.8	2.47

各群 5 匹の平均値

正常白ネズミに塩化 adrenaline 0.1 mg (0.8 mg/kg) を皮下注射し 30 分後に採血測定した。成績は第 4 表の通りである。

第 4 表 正常白ネズミに adrenaline 投与成績

群	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
1	233	693	460	
2	332	646	314	
3	233	730	497	
平均	266.0	689.6	424	2.6
此の群の対照	176.5	693	516.5	3.9

1 群 5 匹 3 群の平均値

血清鉄は、266%、TIBC は 690% を示し、対照群に較べて血清鉄は 50.7% の増となつたが、TIBC は対照と殆ど同値であつた。不飽和度をみると対照の 516.5% に対し 424% で約 18% の減少となつた。なお coefficient は対照の 3.9 より 2.6 と減少した。

b) 正常家兎の場合

家兎に塩化 adrenaline 0.4 mg/kg の割に筋注射し時間的に追跡実験を行つた (第 5 表)。

の様になつた。

血清鉄は 174.6% で剔出のみの 150.2% に対し 16.3% の増加を示し、TIBC は約 16.5% の増となつた。又不飽和度は 16.7% の増であり、結局すべてに於て 16% 程度の上昇となつた為 coefficient は 2.47 に対し 2.46 で不変の結果となつた。

4) atropin の影響

a) 正常白ネズミ

正常白ネズミに 0.005% 硫酸 atropin 1.0 ml 皮下注射後 45 分で測定した。成績を示すと第 7 表の通りである。

第 7 表 正常白ネズミに atropin を注射した時の血清鉄及び TIBC

	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
atropin 投与	185.2	463.1	277.9	2.5
対 照	139.2	417.0	277.8	3.0

各群 5 匹の平均値

血清鉄及び TIBC の変動はあまり大とはいえないが、それでも血清鉄は約 33%, TIBC は 11% の増加を示した。不飽和度は両者共同値で血清鉄が増加しただけ TIBC が増加したことを示している。

b) 副腎剔出白ネズミに atropin を投与した場合
実験方法は Adrenaline の場合と同様である。成績は第 8 表に示した。

第 8 表 副腎剔出白ネズミに atropin を注射した時の血清鉄及び TIBC

	血清鉄 $\gamma\%$	TIBC $\gamma\%$	不飽和度 $\gamma\%$	co-efficient
副腎剔出 + atropin	180.2	413.8	233.6	2.3
副腎剔出	150.2	370.0	219.8	2.47

各群 5 匹の平均値

血清鉄の増加は 20% であったが TIBC は 11.8%, 不飽和度は 6.3% 何れも増加を示した。adrenaline を剔出動物に投与した場合と同様共に増加を示したので coefficient には変化がない。

5) ACTH の影響

副腎皮質 hormone が血清鉄及び TIBC に及ぼす影響は後述の通りであるが、この hormone の分泌に密接な関係を持つ ACTH 投与時の TIBC 及び不飽和度についてみた。動物は体重 2 kg の雄家兎を用い、ACTH 10 単位を筋肉内に注射し、最もその効果が著明に現われる 5 時間後に採血して注射前の値と比較した。

第 9 表 ACTH 注射時の血清鉄と TIBC (家兎)

	血清鉄 $\gamma\%$		TIBC $\gamma\%$		不飽和度 $\gamma\%$	co-efficient
	注射前	注射後	注射前	注射後		
1	131	71	678	530	前後 547 後 459	
2	180	95	476	429	前後 296 後 334	
3	304	215	550	487	前後 246 後 272	
4	307	199	609	577	前後 302 後 378	
5	187	180	651	667	前後 464 後 487	
平均	221.8	152.0	592.8	538.0	前後 371 後 386	前 2.68 後 3.54

第 9 表の通り血清鉄は注射前に比し 31.5% の減少であったが TIBC は 9.3% の減少である。不飽和度には大した変化がみられなかつた。coefficient は注射前に於て 2.68 注射後に 3.54 と変化した。

6) Cortisone の影響

Hydrocortisone 25 mg を前同様家兎の筋肉内に投与して 5 時間後に測定した。成績は第 10 表の通りで

ある。

第 10 表 Cortisone 注射時の血清鉄と TIBC (家兎)

	血清鉄 $\gamma\%$		TIBC $\gamma\%$		不飽和度 $\gamma\%$	co-efficient
	注射前	注射後	注射前	注射後		
1	145	130	700	634	前後 555 後 504	
2	198	168	466	434	前後 268 後 266	
3	275	158	525	461	前後 250 後 303	
4	244	126	503	418	前後 259 後 292	
5	201	184	566	480	前後 365 後 296	
平均	212.6	153.2	552.0	485.4	前後 339.4 後 332.2	前 2.6 後 3.16

血清鉄の減少効果は ACTH の場合よりもむしろ弱く 28.0% の減少を招き、TIBC は多少大きく 12.0% の減退を示した。不飽和度は殆ど変化なく coefficient は 3.16 と変化した。

7) DOCA の影響

DOCA 5 mg を家兎に筋肉内注射として投与し、5 時間後に採血測定した。第 11 表にその成績を示した。

第 11 表 DOCA 注射時の血清鉄と TIBC (家兎)

	血清鉄 $\gamma\%$		TIBC $\gamma\%$		不飽和度 $\gamma\%$	co-efficient
	注射前	注射後	注射前	注射後		
1	124	118	577	571	前後 453 後 453	
2	272	215	365	365	前後 93 後 150	
3	219	154	519	440	前後 300 後 286	
4	131	101	424	339	前後 293 後 238	
平均	186.5	147.0	471.3	428.8	前後 284.8 後 281.8	前 2.43 後 2.92

第 1 例では変動は正常範囲と思われるが平均に於て血清鉄は 21.2% TIBC に於て 9.0% の減少を示した。不飽和度は大して変化なく coefficient は 2.43 から 2.92 と変化した。

前述の如く adrenaline 投与で血清鉄の増加するのを認めたが、これは何処からの鉄の遊出に原因するのであろうか。これを解析する為に動物に鉄を多量に投与して臓器鉄を増加せしめて実験した。

8) 鉄負荷の影響

鉄の負荷による血清鉄の変動はよく知られているがその際の TIBC について検討した所次の様な結果を得た。

a) 鉄過剰白ネズミについて

白ネズミの腹腔内にクエン酸鉄アンモンを 1 回 2mg

10回注射して最後の投与後 24 時間で測定した。成績は第 12 表の通りである。

第 12 表 鉄過剰白ネズミの血清鉄と TIBC

群	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
1	408	762	354	
2	243	615	372	
3	419	722	303	
平均	356.6	699.6	343.0	1.96
正常	178.7	593.1	414.4	3.32

1 群 5 匹 3 群の平均値

血清鉄の増加量は 177.9 $r\%$ で実に約 100% の増加を見たが、TIBC に於ては増加は 106.5 $r\%$ でその割合は 18.0% に止まつた。不飽和度は 17.2% 減少した。当然 coefficient は小となり 1.96 を示した。

b) 鉄過剰白ネズミに Adrenaline を投与した場合 adrenaline の影響は前述の通りであるが鉄過剰動物に投与した際の影響をみた。前記の鉄過剰白ネズミに塩化 adrenaline 0.1 mg 皮下注射し、60 分後に測定した結果は次の通りである。

第 13 表 鉄過剰白ネズミに adrenaline 注射した際の血清鉄と TIBC

群	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
1	285	600	315	
2	236	579	343	
3	287	627	340	
平均	269.3	602.0	332.7	2.23
鉄 (+) ad. (-)	356.6	699.6	343.0	1.96

60分後の値では血清鉄は 24.4% の減少をみ、TIBC に於ては 14% の減少となり、不飽和度には大した変化はなく、coefficient は若干増加した。

b') 鉄過剰家兎に adrenaline 投与の場合

同様の鉄過剰時に於ける adrenaline の影響を家兎を用いて実験した。家兎はクエン酸鉄アンモン総量 500 mg を 17 日間に分割静注して最後の注射後 48 時

第 14 表 鉄過剰家兎に adrenaline を注射した際の血清鉄と TIBC

	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
前	319	461	142	1.45
15分	319	461	142	1.45
30分	301	434	133	1.44
60分	280	402	122	1.44
90分	296	493	197	1.66

間で塩化 adrenaline 0.4 mg/kg 筋注した。これを時間的に測定すると第 14 表のようになる。

血清鉄は注射前より 15 分迄は変化がないが、30分より 60 分迄は減少の傾向にあり 90 分後には増加し始めている。TIBC は注射前より 15 分迄は変化なく 30分より 60 分迄は減少し 60 分を底として 90 分では再び上昇している。即ち血清鉄と TIBC は両者共 60分を底とした曲線を描き相関関係にあることを示している。不飽和度も又同様であつた。

c). 鉄過剰白ネズミの副腎剔出時に於ける adrenaline の影響

白ネズミを前述の要領で鉄過剰とした後、副腎を剔出して術後 4 日目に adrenaline を皮注して 80 分後に実験を行つた。これを第 15 表に示した。

第 15 表 鉄過剰副腎剔出白ネズミに adrenaline 注射時の血清鉄と TIBC

	群	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
鉄過剰 + 副腎剔出	1	244	677	433	
	2	292	691	399	
	3	265	677	412	
	4	211	635	424	
	平均	253.0	670.0	417.0	2.65
鉄剔出 + アド 副腎レ	1	212	614	402	
	2	270	635	365	
	3	248	593	345	
	平均	243.3	614.0	370.6	2.52
副腎剔出		150.2	370.0	219.8	2.46

対照として行つた鉄過剰動物の副腎剔出実験では副腎剔出のみの場合と較べて血清鉄、TIBC 共に下降していない。又 adrenaline を投与しても 4% の血清鉄の下降、8.4% 程度の TIBC の下降をみたので adrenaline の影響は大したものとは考えられなかつた。不飽和度はそれでも 11% の減少となり、coefficient は 2.65 から 2.52 と変化した。

d) 鉄注射後 2 時間迄の変化

鉄の連日投与を約 2 週間実施し鉄過剰状態とするとその TIBC が上昇することを前記の実験で知つたが Goldeck⁷⁾ は正常人及び各種疾患について鉄投与直後よりの変化を観察しているが、これを家兎を用いて鉄注射直後より 2 時間迄は如何様な変化を持つているかを実験した。クエン酸鉄アンモン 5 mg/kg を静注した。

第 16 表 鉄注射による血清鉄と TIBC の注射後 2 時間迄の変化 (家兎)

	I				II			
	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient	血清鉄 $r\%$	TIBC $r\%$	不飽和度 $r\%$	coefficient
前	178	477	299	2.68	187	604	417	3.24
5分	1,920	1,670	—	—	2,050	1,620	—	—
10分	1,605	1,286	—	—	1,430	1,185	—	—
30分	925	990	65	1.07	890	1,005	115	1.13
60分	614	779	165	1.27	586	720	134	1.23
120分	406	508	102	1.25	418	686	268	1.64

注射後 5 分値を見ると血清鉄は勿論急上昇をしているが TIBC も共に莫大な上昇を見せている。そしてこの場合血清鉄の方が TIBC より上廻るという現象を見た。時間の経過につれ血清鉄も TIBC も下降して行つたが、尚 10 分値では血清鉄が TIBC より上廻り、30 分に至つて始めて TIBC が血清鉄よりも多い値をとつた。そして 60 分、120 分と進むにつれ不飽和度も増加を見せている。coefficient も従つて 30 分より 120 分迄増加を示した。

9) 低蛋白血症の場合の変化

次に低蛋白血症に於ける TIBC の変化について観察した。2 kg の雄家兎を約 50 ml 耳静脈より凝固防止液を入れた注射筒で採血した後、これを遠沈して上清を捨て、沈査を生理的食塩水で稀釈し有形成分浮遊液としてこれを再び耳静脈より注入し低蛋白血症の家兎とした。この実施前と実施後 12 日迄の血清鉄及び TIBC の変化は第 1 図の様になつた。

第 1 図 低蛋白血症を起さしめた時の血清鉄と TIBC の変化
S = 血清鉄を示す
T = TIBC を示す

先ず TIBC の変化を見ると第 I 例では 3 日目迄下降し 3~5 日にかけ上昇 7 日目を頂点とし 12 日目に向つて下降している。第 II 例では 1 日目に既に上昇したが 2 日目は下降した。次いで 3 日目より上昇、7 日

目を頂きとして以下下降を示す。第 III 例では 1 日目下降、2 日より 3 日にかけて上昇し 4~5 日と下り 7 日目に稍上昇以下 12 日目に向つては殆ど変化がない。

第 II 例でははつきりしているがどの例に於ても 7 日目が 1 つの山をなしていることは興味あることであつた。又何れの例に於ても 12 日目では操作前の TIBC より高値を示し而もそれが皆 500 $r\%$ 前後を示していた。

血清鉄も II, III 例では 7 日目に、I 例だけ 5 日目に同様な山を呈した。又 II, III 例では血清鉄は操作前よりも低値を示した。

10) ascorbin 酸の影響

TIBC に及ぼす還元剤の影響をみる為に ascorbin 酸を 100 mg/kg の割に家兎に皮下注射し時間的に追跡してみた所次の様な曲線を得た。

第 2 図 ascorbin 酸注射時の血清鉄と TIBC の変化

大体に於て TIBC は注射後 20 分迄は注射前より低値をとり 30 分では回復し始め、以後は注射前値より高値をとる様に思われた。血清鉄も類似の傾向にあり、特に第 III 例では TIBC と血清鉄は完全な平行関係を見せた。

考 按

緒論で述べた通り血清鉄の変動に及ぼす hormone の影響は、従来共同研究者をはじめとして多数の学者によつて報告されてきた^{1), 2), 3), 8)}。これに反し血清鉄飽和度 (TIBC) の変動と hormone との関係についての研究は余りなされてない様である。血清鉄飽和度は結局血清中の siderophilin 量を求めることに他ならないから、蛋白質の代謝に密接な関係を持つ副腎系の hormone と相関のあることは当然予測出来るので、この点を研究課題として取り挙げた理である。

ネズミの副腎を摘出すると脱落症状を起し、1週間以内に斃れるが、手術後4日目の検体について TIBC を測定すると著しく低減している。この際血清鉄も又減少するが TIBC 程著しくはない。この成績は副腎 hormone の欠如によつて起つたことは明瞭であるが、それでは一体副腎 hormone のうちどの hormone がこの変化と最も密接な関係を持つものかを知るため、副腎系 hormone の内 2, 3 のものについて検討を試みた。

先ず副腎髄質 hormone である adrenaline を用いて実験した。adrenaline 投与によつてネズミでも家兎でも共に初期に血清鉄は増加し TIBC は殆ど変化を認めなかつた。殊にこの変化は家兎を用いて逐時間的に追つた実験で明らかである。

adrenaline によつて短時間血清鉄の増加することは既に山口⁸⁾によつて報告され、詳細な検討が行われているが adrenaline のこの様な作用は直接に臓器に作用して血清鉄の増加を招くためと解釈している。

adrenaline は他方当然副腎に作用して cortisone 系 hormone を分泌するから後述の cortisone の作用を考慮に入れて考えるべきである。こゝで副腎剔出動物を使用して cortisone 系 hormone の動きを除外して adrenaline の効果をみると副腎剔出によつて降下した血清鉄は再度上昇する。このことは adrenaline の上昇作用が副腎を介せず作用し得ることを示しているが、一方 TIBC も増加を招く。副腎を除去した場合は前述の如く血清鉄の降下と TIBC の下降をみるから adrenaline 自体は何らかの途を通して TIBC を増加させる作用が存在する様にも考えられる。例えば cortisone 系の hormone の消失により細胞の透過性の亢進を招いた状態の動物に adrenaline を投与すると組織蛋白質の遊出が起るのかもしれない。若しそうだとすれば副腎剔出動物に adrenaline を注射した時に起る血清鉄の上昇も或は同様の機序によるとも云え

る。

副腎 hormone である cortisone を投与すると血清鉄は降下し、同時に TIBC も大きく減少する。cortisone のこの血清鉄降下作用は網内系組織の活性化によつて起るものと現在考えられている。

ACTH の投与によつても同様の所見を得るが、これは cortisone の分泌を介して行われるとすれば当然であろう。cortisone と ACTH を比較すると多少血清鉄値の減少度に差を認めるが、これは hormone の効果がその投与量並びに時間的な関係に支配されることが大きいと思われる。cortisone 及び ACTH の投与による TIBC の減少はどの様に解釈出来るであろうか。時に全く paradox を示すことがあるので一方的な解釈をつけるわけにはゆかないが、cortisone は所謂 gluconeogenesis を営む hormone であり、又組織内で protein の分解を促進する作用があるといわれている。cortisone 投与で血糖の上昇を伴ない、尿中窒素排泄増加など体蛋白分解の増加を思ひしめる所見のあること等は広く承認されている。従つて体蛋白体の分解が起るための部分現象として TIBC, siderophilin の減少をも招くとも考えられるが満足な説明とは考えられない。この点については更に追究中である。

結 論

1. 副腎剔出動物では血清鉄の低下と共に総鉄結合能も低下する。
2. 正常動物に対しては、ACTH, cortisone, DOCA などは血清鉄及び総鉄結合能を低下せしめ、又 adrenaline は上昇せしめる。此の際血清鉄と総鉄結合能の間には相関関係がある。
3. 鉄過剰動物では血清鉄、総鉄結合能両者共増加するが総鉄結合能の増加率は血清鉄のそれよりも小さい。従つて不飽和度も小となる。
4. 鉄投与動物に (家兎) adrenaline を投与すると血清鉄は投与後 60 分迄低下し以後は上昇する。総鉄結合能も正相関的に変化し、不飽和度も同様な変化をするが、coefficient 殆んど変化しない。
5. 鉄過剰動物の副腎を剔出するとその後 adrenaline はを投与しても余り影響がない。
6. 鉄注射後 2 時間迄の変化では両者共激増するが 30 分以前は血清鉄値が総鉄結合能を上廻る。30 分以後に於て総鉄結合能が高くなる。投与後 2 時間で総鉄結合能は元え戻るが血清鉄は未だ高い。
7. 低蛋白血症では総鉄結合能は 7 日目頃に最大の

増加がある。

8. ascorbin 酸では総鉄結合能は注射後 20 分迄低くなり以後は回復する。

稿を終るに臨み 終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました恩師島田教授に 衷心より深く感謝致します。併せて種々御鞭撻御便宜を与えて下さった 中島信治博士, 吉野芳夫博士を始め教室員諸氏に感謝致します。

文 献

1) Cartwright G.E. et al.: J. Clin. Invest., **25**, 81

(1946)
2) Hamilton L.D. et al.: Endocrinology, **48**, 44 (1951)
3) 栗原宏至: 日医大誌, **23**, (1), 16 (1956)
4) Cartwright G.E., et al.: J. Clin. Invest., **30**, 161 (1956)
5) 野田真男: 生化学誌, **29**, 199 (1957)
6) 斎藤 達: 日医大誌, **27**, (12), (1960)
7) Goldeck H. et al.: Klin. Wochschr., **31**, 608 (1953)
8) 山口文男: 日医大誌, **27**, (1), 23 (1960)

27 卷 10 号 相 沢 論 文 正 誤 表

頁	側	桁	誤	正
5	(表 8)		$N M \pm m(\mu)$	$N M \pm m(\%) /$
8	左	上より 8	よりなるがその外周は	よりなるが結合組織内の 弾性線維は
8	右	下より 9	小橋の	稲葉の
8	右	下より 8	では 44.8 において比較的	では比較的
8	右	下より 6	太く大胸筋は	太く, 又小橋は大胸筋は
8	右	下より 1	とも小橋の成績	とも稲葉・小橋の成績
9	右	下より 19	彼の説に照	稲葉の説に照
10	右	下より 16	Endomysium は一般に狭く	さらに個々の筋線維をみると
10	右	下より 5	を呈しさらに高	を呈し, また円形を示す線維 もみられるがそれらは著るし く不正形である。さらに高
10	右	下より 4	Endomysium も漸	Endomysium も再び漸
12	左	上より 1	線維鞘年期	年期

本論文中移行期前期中には幼期も含まれるものとする。