第63回日本内科学会講演会 (1966年)

赤血球の臨床*

東京大学教授 中 尾 喜 久

CLINICAL STUDY ON THE RED BLOOD CELL

Kiku NAKAO, M.D.

The Third Department of Internal Medicine Faculty of Medicine,
University of Tokyo

哺乳動物の赤血球は外見はなほだ単調な、核をもたない細胞であるが、その営む生活現象はけつして単純ではなく、また、その果す機能も複雑多岐である。わたくしは、赤血球の営む種々な代謝、機能の異常状態をできるだけ臨床医学に忠実な立場から追究してみようと企図した。

まず、流血液中の赤血球数が常に一定であるための調節機構に関する erythropoietin の作用機序に検討を加えた。つぎに、赤血球の特徴的な機能を発揮、維持するために必要な諸現象のうち、1) 血色素の生合成、2) energy 源としての解糖現象、3) 赤血球の膜透過性の問題、そして4) 強い還元能の問題をとりあげて、これらの機能に異常がある場合の病態を追究した。

以下、その成績について述べる。

I. 赤血球産生の調節

赤血球が流血中で、常にはほぼ一定数を保つためには、その産生と崩壊との間に調節機構が存在するはずである。近年、この機構に erythropoietin とよばれる体液性因子が関与することが明白となった。

まず、erythropoietin の作用機序につき、次にその臨床的意義につき述べる。

$\frac{1}{2}$ 気圧の部屋でマウスを飼育すると、流血中の

網赤血球は急速に増加し、Ht 値も上昇する。すなわち、赤血球産生能は著しく昂進する。これらの動物を大気中にもどすと、網赤血球数は急速に減少し、放射性鉄利用度で判定した赤血球産生能はほぼ零に低下する。

この事実は、低酸素分圧のもとでは、赤血球産生が旺盛となり、赤血球増加症をおこすが、そのまま大気中にもどすと、赤血球産生は一時停止状態になることを示している。

この赤血球産生能の調節に erythropoietin が関与することが解明されている。

再生不良性貧血患者の尿から erythropoietin 活性物質を抽出すると、NIH より入手した erythropoietin、すなわち、Goldwasser らの分画法による

図1. エリトロポエチン (Step III NIH) を構成する中性糖のガスクロマトグラム

* 本講演は昭和41年4月3日、福岡市福岡市民会館にて行なわれた。

図2. エリトロポエチン(尿抽出)を構成する中性糖のガスクロマトグラム

いわゆるstep IIIとの組成がよく類似した物質をうる。すなわち、まず、含有中性糖をgaschromatographyで検討すると、step III分画にはmannoseとgalactoseとが、ほぼ1:1の割合に含まれ、尿抽出物にはmannose, galactose以外にfucose, glucoseが認められた(図1, 2)。また、赤外線吸収spectrumでは、両者の構造がpeptid結合、OHの位置その他の点でもよく類似している。

また、Elson & Morgan方法でhexosamineを、Klenk & Langerbeim法(山川変法)でsial酸を測定すると、尿抽出物ではhexosamine, sial酸は1.25:1の割合に含まれている。Galdwasserらが貧血羊血漿より分画したerythropoietinでは、その比が1.35:1で、かなりよく一致している(表1)。hexosamine, sial酸の含有量が高くなる程、生物学的活性が増強するようである。またsialidaseで、sial酸を分解するとerythropoietin活性は消失する

表1. エリトロポエチンのアミノ糖値と生物学的活性

	Hexosamine(%)	Sialic acid(%)	活性値 Co.U/mg
Ep(ⅢNH)	6.10	7.0	1.6
Ep(尿抽出)	9.99	8.0	8.0
(中尾等)			
Ep(Ⅳ)	10.5	7.5	30.0
Ep(Ⅴ)	17.5	13.0	450.0

by Goldwasser et al
(Erythropoiesis 1962)

図3. 輸血或いは低酸素多血症マウスにおける赤血球生成能

ことからsial酸はerythropoietin活性の必須成分と解される。

Erythropoietinの作用機序

まず、輸血あるいは低酸素室で多血症にしたマウスの造血能をみると、網赤血球数はほとんど零、放射性鉄の利用率も1.0%以下に低下、脾臓内赤芽球もほとんど認められない(図3)。

このような多血症マウスに4~6 Co単位のerythropoietinを注射すると、24時間で脾臓内に大型赤芽球が出現し、48時間で小型赤芽球が増加し、その数も頂点に達する。

また、erythropoietin注射後8および25時間目にtritium標識cytidineを注射し、1時間後に脾臓の塗抹標本作製、radioautographyを行なうと、8時間で大型幼若細胞に多数のgrainを認め、24時間で標識細胞数が増加する。これは早期にRNA合成の盛んな細胞の出現を意味する。また、tritium標識thymidineを24時間目と48時間目とに注射し、1時間後に同じく脾塗抹標本作成し、その感光顆粒をみると、24時間目には大型細胞に、48時間目では多数小型細胞核にgrainが認められ、この時期にはDNA合成が活発であることを示した。

次に、多血症マウスにerythropoietinを注射し、

図4. 多血症マウス脾の核酸分画 (エリトロポエチン注射8時間後群)

種々の時間的間隔で ^{32}P -正リン酸を注射し、3時間後に脾よりOgur-Rosen法で核酸を抽出し、各時期の単位量のRNAとDNAとの放射活性を測定し、その比を求めると、2～8時間ではRNA放射活性がより強く、次第に低下して、24時間以後にはDNAの放射活性がむしろ強くなる。さらにdodecyl硫酸ソーダを用い、phenol法で、erythropoietin注射8時間後の多血症マウスの脾より核酸を抽出し、methyl化ウシalbumin columnにかけ分画し、260m μ における吸光度を測定すると共に、その放射活性を求めた。図4の上段に示すようにribosomal RNAの新生が盛んである。erythropoietinと同時にmessenger RNAの合成阻害剤とみられるactinomycin Dを体重1g当り0.28 γ の割合に注射し、8時間後の脾から前述の方法で核酸を抽出し、検討するとribosomal RNAの新生が殊に著しく阻止されている(図4の下段)。

Ribosomal RNAとsoluble RNAとの比放射能を求め、その比を計算すると、erythropoietin注射8時間目にはribosomal RNAの新生が優位にある

表2. エリトロポエチンおよびactinomycin-D注射による多血症マウス脾の核酸分画内 ^{32}P 摂取率の変化

	匹数	Ep Co単位/匹	^{32}P $\mu\text{C}/\text{体重}$	比放射能		比放射能比 r-RNA/s-RNA
				r-RNA	s-RNA	
対照群	5	0	1	48.8	52.0	0.94
Ep注射群	5	6	1	128.1	101.6	1.26
Ep注射群	5	6	3	447.5	305.0	1.40
Act-D Ep注射群	5	6	3	120.0	183.0	0.66

比放射能 C.P.M./O.D.₂₆₀

が、actinomycin D注射群では、ribosomal RNAの新生がsoluble RNAのそれに比して、著しく抑圧されている(表2)。

以上の実験結果から、erythropoietinはまず幹細胞stem cellのribosomal RNAの新生を誘発すると解される。しかも、その誘発はactinomycin Dによつて阻止されることから、それはおそらくmessenger RNAであろうと推論される。

次にerythropoietinにより誘発された多血症マウス脾の赤血球産生の過程を、赤血球に特異な営みである血色素合成の観点から検討した。

まず、多血症マウスにerythropoietinを注射し、経時的に放射性鉄を腹腔内に注射し、その後4時間の脾の鉄摂取を測定し、なおDrabkin試薬を用い、酸性methyl-ethyl-keton法でhemeを抽出し、それへの放射性鉄の取り込みを調べると、脾の鉄のとりこみは2時間までは有意の増加をみないが、8時間後にやや高まり48時間で最高に達し、以後は漸減した。heme合成は8時間では未だ明らかでないが24時間で増加が明瞭となり($P < 0.1$)、48時間で最高に達し($P < 0.001$)、72時間で低下を示した($P < 0.01$)。

次に ^{14}C -glycine 4 μC をマウスに注射し、全く前と同じ実験を行なつて、脾からAnson-Mirsky法でhemeとglobinとを分離、抽出しhemeおよびglobinに取り込まれた放射活性を測定した。globinは12時間頃より新生が認められ、heme合成は24時間から認められた。globin合成が先行することは注目

図5. ALA synthetase, ALA dehydrase, heme synthetase の抽出法

すべき所見である。

次に, heme合成に関与する主要な酵素活性について検討を加えた。その際, それぞれの酵素活性成分としては図5に示すような操作で, 脾, 骨髓, 網赤血球から mitochondria 分画と上清とを分離してこれを酵素液として用いた。

Heme合成酵素活性を測定するにはLabbeらの方法を若干変更して用いた。本酵素は mitochondria 酵素であるので, erythropoietin 注射後それぞれの時間を経過した赤血球増加症マウス脾から前述の方法で分離した。

Mitochondriaを用い protoporphyrin を基質として培養し, 放射性鉄と protoporphyrin とから新しく合生される heme の比放射能を検討した。heme 合成酵素活性は erythropoietin 注射後 28 時間で増強し, 52 時間で最高に達した。

δ -aminolevulin 酸脱水酵素は 2 分子の δ -ALA を縮合して, porphobilinogen にする作用をもち, 細胞質中に存在する。したがって前述分画の上清成分を用い, glutathione (GSH) を含む緩衝液に孵

図6. 多血症マウス脾 ALA synthetase 活性に対するエリトロポエチンおよび actinomycin D の影響

置し, さらに δ -ALA を加えて, 新たに合成される porphobilinogen を測定した。その結果, erythropoietin 注射後 12 時間で有意にたかまり, 52 時間で頂点に達した。

δ -aminolevulin 酸合成酵素は succinyl CoA と glycine とから δ -ALA を合成する過程に作用する mitochondria 酵素である。erythropoietin を注射した赤血球増加症マウス脾から前述の方法で分画した mitochondria 成分を培養し, 基質 α -ketoglutarate と glycine とから産生される δ -ALA の量を Mauzerall & Granick 法で測定した。その結果は erythropoietin 注射後 8 時間ですでに活性の増強を示し, 52 時間で頂点に達した。

次に messenger RNA 合成の阻害剤である actinomycin D の体重 g 当り 0.2 γ を, erythropoietin と同時に注射し, 8 時間後の脾内の ALA 合成酵素活性を測定すると, その活性の上昇は全く認められない。erythropoietin 注射に 6 時間おくらせて actinomycin D を注射すると脾内の ALA 合成酵素活性はわずかに抑制されるのみである (図6)。すなわち, actinomycin D は erythropoietin 作用の極めて初期の stage を阻害するものと解される。

以上, 赤血球増加症マウスに erythropoietin を

図7. 培養多血マウス脾のheme合成

注射すると、脾内に赤芽球系細胞の新生をもたらす事実を形態学的ならびに生化学的に立証した。

次に、これら現象がerythropoietinの直接作用か否かを組織培養法で検討した。すなわち、赤血球増加症マウスの脾小切片をローラーチューブ内壁にはりつけ、0.1～0.2Co単位のerythropoietinと放射性鉄とを含む液中で培養し、時間的に脾組織内に出現する赤芽球を形態学的に観察し、さらにhemeを抽出してその放射活性を測定しその合成率を検討した。培養前には赤芽球は全く認め

られないが、24時間で大型赤芽球を認め、48時間では小型赤芽球を多数に認めた。heme合成率をみると6時間では対照と差を認めないが、24時間では僅かにhemeの放射活性の増加を、48時間では著しい増加を示した。また、1ccあたり0.1γのactinomycin Dを培地に加えて48時間培養するとheme合成は全くみられない(図7)。また培養の前半、後半の24時間のみactinomycin Dを作用させると、いずれもheme合成は著しく阻害される。

このin vitroの実験成績は、erythropoietinは造血系の幹細胞stem cellに直接作用して赤芽球へ分化せしめるものであること、しかもこの現象はactinomycin Dによつて阻止されることを明らかにした。

以上の実験成績を総括、考案すると、erythropoietinの作用機序を図8のような模式図で示すことができる。すなわち、erythropoietinは幹細胞stem cellに到着して、まずribosomal RNAの新生を誘発する。これはactinomycin Dにより阻止される。最近、actinomycin Dの作用点について若干の論議があるがerythropoietinに関する実験の範囲では、従来の考え通り、actinomycin Dはmessenger RNAの合成阻害剤と解してよいと考える。したがって、そこに新生されたmessenger RNAがpolysomを形成して、ALA合成酵素が新生され

図8. エリトロポエチンの作用機序模式図

る。他方, globin系に対してもoperonが作動するものと解される。次いで鉄摂取, ALA dehydrase 活性の上昇, DNA合成の亢進, heme合成酵素活性の出現, そしてheme合成が認められるようになる。

赤芽球の分化と成熟とはこのようにして進展するものと理解することができる。

Erythropoietin活性の臨床

臨床的にerythropoietin活性を測定するには, 48時間飢餓ラット, あるいは赤血球増加症マウスを用い, 皮下に資料を注射し, 次いで放射性鉄 $0.5\mu\text{c}$ を腹腔内に注射し, 一定時間後に採血, 赤血球への利用率を求めた。また, erythropoietin活性を基準化するためにCo単位を使用した。すなわち, $5\mu\text{Moles}$ の CoCl_2 が赤血球産生を促進せしめるのに匹敵するerythropoietin活性を1 Co単位とした。赤血球への鉄利用率とCo単位の対数とは明らかな相関を示す。

種々貧血における血漿erythropoietin活性を測定すると, 再生不良性貧血では著しく増強しているものが多く, これに反し慢性腎不全(尿毒症)による貧血では, 貧血が高度でもerythropoietin活性は低値であることが多い。その他の貧血では, 一般に貧血の程度とerythropoietin活性とが, 大体負の相関を示した。

真性赤血球増加症では, 14例中1例の例外はあ

表3. 真性多血症における血漿エリトロポエチン

症例	年齢	性	Hb (g/dl)	RBC ($\times 10^6$)	WBC ($\times 10^3$)	エリトロポエチン
1)	46	男	18.6	600	99	(-)
2)	57	男	19.6	671	74	(-)
3)	51	女	21.2	784	140	(-)
4)	56	男	20.8	952	172	(-)
5)	60	男	24.0	850	174	(-)
6)	46	男	19.6	663	121	(-)
7)	42	男	18.5	680	214	(-)
8)	70	女	22.7	760	121	(-)
9)	44	女	18.2	736	118	(-)
10)	58	男	18.8	768	100	(-)
11)	27	男	17.2	809	133	(-)
12)	40	男	19.6	613	66	(-)
13)	50	男	20.2	742	131	(-)
14)	64	男	17.0	916	176	(+)*

* 栗粒結核合併

るが, すべてerythropoietin活性はほとんど認められない(表3)。これに反し, 二次性赤血球増加症では, 12例中3例の例外はあるが, 他はerythropoietin活性の増強を示した(表4)。殊に症例12の40才男子の肝癌例では, 肝腫瘍組織から強いerythropoietin様活性を有する物質を抽出しえた。かかる腫瘍はerythropoietin産生腫瘍と解され, 腎癌, 子宮癌, Von Hippel-Lindau病などに認められることがあつて, 近年注目されている。

二次性赤血球増加症では血色素量とerythropoietin活性とが正の相関を示し, erythropoietin活性の増強がむしろ原発性病変と解されが, 前述の諸貧血の場合のerythropoietin活性は貧血の程度と負相関を示し, 貧血が原発でerythropoietin活性

表4. 二次性多血症におけるエリトロポエチン

症例	年齢	性	原 疾 患	Hb (g/dl)	RBC ($\times 10^6$)	WBC ($\times 10^3$)	エリトロポエチン
1)	41	男	気管支喘息 肺線維症	20.8	612	87	(*)
2)	56	男	肺気腫 肺線維症	16.6	518	69	(+)
3)	65	男	肺気腫	18.0	578	137	(-)
4)	41	男	肺腫瘍	20.4	635	68	(*)
5)	43	男	肺性心 右肺切除	12.2	555	38	(+)
6)	16	男	ファロー四徴症	18.7	701	69	(+)
7)	18	男	ファロー四徴症	19.0	790		(+)
8)	68	男	高血圧性心不全	19.2	680	110	(*)
9)	25	男	メトヘモグロビン血症	18.0	616	51	(-)
10)	33	男	腎性高血圧	16.0	720	76	(+)
11)	38	男	フォンヒッペル-リンドウ氏病	18.1	605	54	(-)
12)	40	男	ヘパトーマ 肝硬変症	19.0	750	67	(+)
				18.0	696	76	(+)*1)
				17.1	760	64	(-)*2)
				17.1	760	64	(+)*3)

*1) 原 *2) 肝ホモジェネート *3) 腫瘍ホモジェネート

図9. 再生不良性貧血(例)における輸血の赤血球生成能に及ぼす影響

は二次的に変動するように解されることと併せ考えると興味ある所見である。

尿抽出のerythropoietinを血液学的に正常な1症例に注射すると、著明な網赤血球の増加を示し骨髓中に赤芽球の増加をみとめた。尿毒症、その他の患者でも同様の反応がみられる。しかし、発熱など若干の副作用を伴うことがあり、広く臨床的に使用するにはまだ問題が残されている。

Erythropoietin作用の観点から、貧血の輸血治療には再考すべき問題がある。再生不良性貧血患者に輸血すると、血漿中のerythropoietin活性は低下し、骨髓中の赤芽球数も減少し、放射性鉄による血漿鉄交代率、赤血球鉄交代率も低下する(図9)。すなわち、再生不良性貧血では造血能を促進させようとする自己調節の反応力を弱くする結果になるので、本症に対する輸血の量は必要量最少限にとどめるべきであると考えられる。

II. 血色素合成障害とその臨床

血色素合成障害は貧血の重大な原因となる。

1. 鉄欠乏性貧血

鉄欠乏性貧血の際の赤血球は周知の通り、小球性、低色素性で、骨髓赤芽球も小形萎縮したものが多い。血清鉄の低下、不飽和鉄結合能の上昇、飽和率の低下、さらに赤血球中遊離protoporphyrinが著しく増加していることが特徴的である。

本症赤血球をhemolysateにして、放射性鉄と培養しても、hemeは新生されないが、この培養系にアヒル赤血球よりcholesterolで抽出したheme合成酵素を加えるとprotoporphyrin量は減少し、hemeが

新生される。すなわち、本症赤血球の遊離protoporphyrinは鉄不足のためにhemeになりえないままに、heme合成酵素活性が減弱してしまった状態と理解される。

前述の方法で、本症患者の骨髓細胞浮遊液から分離したmitochondria分画および上清液についてheme合成の諸酵素活性を測定した。δ-ALA合成酵素活性は著しく低値を示し、ALA dehydrase活性は著しく高値を示し、heme合成酵素活性はやや低値を示した(図10)。次に、骨髓穿刺細胞浮遊液に¹⁴C-2-glycineを加えて、培養し、Ansonらの方法でheme結晶とglobinとを抽出し、その放射活性を調べた。正常人の骨髓穿刺細胞浮遊液ではheme, globinの新生量は、そこに含まれる赤芽球

図10. 鉄欠乏性貧血におけるポルフィリン・ヘモグロビン合成能

の総数にほぼ正比例する。そこで、本貧血の骨髓穿刺細胞浮遊液を用いて同じ実験を行なうと、同数の赤芽球について、正常人赤芽球に比して、heme, globin, 殊にhemeの合成が明らかに低い(図10)。

流血中のerythropoietin活性が高いにもかかわらず、ALA合成酵素活性が低値を示すことは前述のerythropoietin作用機序と併せ考えると注目すべき所見である。そこで、ALA合成酵素活性を測定する反応系に、 Fe^{++} イオンを加えると正常骨髓では100 μ Moles濃度で明らかなALA合成酵素活性の阻害を示したが、 Fe^{++} イオンをchelateする α - α' -dipyridilを加えておくと、 Fe^{++} イオンの阻害作用は軽減される(図11の上段)。しかるに本貧血骨髓でのALA合成酵素活性は、同じ100 μ Molesの Fe^{++} イオン添加では、むしろ増強される。また、 Fe^{++} イオン100 μ Molesを加えて、骨髓細胞浮遊液をあらかじめ30分間孵置し、しかる後にmitochondriaを分画し、そのALA合成酵素活性を測定すると、正常人骨髓では対照に比して

図12. ^{14}C -glycine, ^{14}C - δ -ALAのhemeへのとりこみとヘミンによる阻害

著しく減弱するが、本貧血では Fe^{++} イオンとあらかじめ孵置しても、本酵素活性は前値に近く、強く保持されている(図11の下段)。この事実はALA合成酵素活性には適量の Fe^{++} イオンの存在が必要であつて、過剰でも不足でも本酵素活性の発現には不利な条件となることを示している。

次に、ヒト網赤血球を ^{14}C -2-glycineあるいは ^{14}C - δ -ALAを基質として培養し、これに種々濃度のheminを加えておくと、glycineからhemeへの合成は20 μ Molesのheminで明らかに阻害され、200 μ Molesでは $1/3$ 以下に低下する(図12)。しかるに δ -ALAからのheme合成はhemin 200 μ Molesまではほとんど阻害を受けない。この事実から遊離heminは δ -ALAより前のstepで、すなわち δ -ALA合成酵素の作用する段階で、porphyrin合成を阻害すると解釈される。遊離protoporphyrinにも全く同様の阻害作用が認められる。遊離hemin, protoporphyrinはporphyrin合成の最初のstepで、しかも、porphyrin合成速度のlimiting factorといわれるALA合成の点にnegative feedback的な、あるいはendproduct inhibition的な作用を示すことは興味ある所見である。

本貧血症では素材としての鉄の不足がheme合成の障害となり、過剰になつたprotoporphyrinが δ -ALA合成のstepにnegative feedback的な作用を

図11. Fe^{++} と骨髓ALA合成

図13. 鉄欠乏性貧血におけるヘモグロビン合成障害

及ぼす。また、鉄不足自体もALA合成酵素の活性発現に不利な条件となつている(図13)。流血中にerythropoietin活性が増強しているにもかかわらず、ALA合成酵素活性が低下していることは、以上の機序からもある程度説明することが可能である。

2. 鉛中毒における色素合成障害

色素量 8.0~13.8 g/dl, 赤血球数 240~392 万程度の貧血をもつ7例の慢性鉛中毒症例を観察し、そのheme合成の病態につき検索した成績を次に述べる。赤血球中にはcoproporphyrin, protoporphyrinの異常増加を認める。尿中へのcoproporphyrinの排泄増加が著しく、多量のALAの排泄、PBG排泄のやや増加傾向等が認められる。

骨髓細胞浮遊液につき、前述の方法で諸酵素活性を測定すると、ALA合成酵素活性はむしろ増強し、ALA dehydratase活性が顕著に低値を示し、heme合成酵素活性も低下している(図14)。骨髓細胞浮遊液による¹⁴C-2-glycineよりhemeおよびglobinの合成能をみると、正常骨髓に比して低下しているものが多い。

ヒト網赤血球に醋酸鉛を作用させ¹⁴C-2-glycineよりhemoglobinの産生をみると、 10^{-4} Molesでheme合成は30%以下に、globin合成は50%位に低下する。

色素合成に対する鉛の障害作用はALA dehy-

図14. 鉛中毒におけるポルフィリン・ヘモグロビン合成能

drase活性の部位で最も顕著である。ALA合成酵素活性はむしろ増強している。このことから尿中に多量のALAの排泄されることが理解できる。heme合成酵素活性も著しく低下し、利用されにくい鉄がsiderosomeとして比較的多く細胞質中に認められるようになる。globin合成の障害、尿中coproporphyrinの由来などについては、なお今後の研究課題である。

3. Porphyria erythropoietica

皮膚の光線過敏症、多毛症、貧血、赤血球に多量のuroporphyrin, coproporphyrin, protoporphyrinを含み、尿にも各種porphyrin、特にそのI型を多く排泄することを特徴とする疾患である。

図15. Erythropoietic porphyria の porphyrin 合成能

症例は68才男子で、家族的に同様疾患を認めない。30才頃より尿が暗赤色になる。皮膚は強い日光に曝されたあと、水泡形成、潰瘍に陥り、組織欠損、瘢痕を残し、ために眼瞼、鼻翼、耳殻、口唇、手指など著しい変形を呈し、多毛、色素異常などが認められる。

血色素9.0 g/dl, 赤血球340万程度、骨髄は増殖性、殊に赤芽球が多い。⁵¹Cr法による赤血球半寿命の短縮、ferrokinetics所見はむしろ造血亢進の像を示した。

骨髄穿刺塗抹標本を260mμの紫外線で鏡検すると、紅に蛍光を発する赤芽球を多数に認める。赤血球中にuro-, copro-, proto-各型porphyrinを多量に含有し、尿中にもこれらporphyrin体を排泄し、ブドウ酒のような色を呈し、紫外線をあてると紅色の蛍光を発する。porphyrinの型をみるとⅢ型とⅠ型との比は1:3で、Ⅰ型の産生が優位をしめる。

骨髄と肝につき、前述の方法で、porphyrin合成に関与する諸酵素活性を測定すると、骨髄ではALA合成酵素、ALA dehydrase活性は増強しているが、肝ではほとんど正常域にある。

赤血球hemolysateを用い、δALAからporphyrin合成能をみると、正常赤血球に比して極めて旺盛であり、赤血球系細胞のporphyrin過剰産生がうかがわれる(図15の右)。要するに、本症赤芽球系細胞のporphyrin合成能は極めて旺盛でALA

合成酵素、ALA dehydrase活性ともに増強を示す(図15の左)。Ⅲ型よりⅠ型が多く産生されるのが特異で、おそらくδ-ALA、PBGの産生が多量であるのに対し、PBG deaminaseと共に作用するPBG isomeraseの活性が、相対的に低くなることがporphyrin Ⅰ型の過剰産生の原因であろうとする最近の考え方を支持する成績である。

4. Thalassemia症候群

Thalassemia症候群の1例でheme合成の検索を行なった。患者は27才のIndonesia人で、溶血性貧血と脾腫を主訴としている。末梢赤血球のHb-F含量は12.9%、形態学的には票的赤血球、Hb-Fを

図16. Thalassemia syndrome 例の赤芽球内 δALA-synthetase, δALA-dehydrase 活性

含む赤血球などがみられる。本症例の骨髓穿刺材料を用い、すでに述べた方法でporphyrin合成諸酵素を検討した。ALA合成酵素, ALA-dehydrase活性ともに著しい低下を示した(図16)。

Mooreらはすでに本症では δ -ALA合成のstepに障害のあることを想定しているが、本症例で、はじめてALA合成酵素活性に明らかな障害のあることを実証しえたことは意義深い。

5. Vitamin B₁₂ と heme 合成

従来, vitamin B₁₂は葉酸とともに核酸代謝に関連をもち、その欠乏はDNA合成異常をきたし、巨赤芽球性貧血を招来すると解されてきた。高色素性であるため、血色素生成の面についての関心は余り払われていなかった。

近年, vitamin B₁₂欠乏状態では尿中にmethylmalonic acidが排泄されることが注目されている。悪性貧血患者の尿に硫酸を加え、エーテルに抽出、HCl-methanolでメチル化し、石油エーテルにて

図17. 悪性貧血患者におけるmethyl-malonic acidの尿中排泄

図18. 兎肝および reticulocyte mitochondria acetone powderにおける propionate-¹⁴Cの methylmalonate, succinate へのとりこみ

抽出、濃縮してgaschromatographyにかけると、markerとしたmalein酸の位置から判定して、明らかに多量のmethylmalonic acidの排泄が認められる(図17の上段)。治療後の尿にはこれを証明されない(図17の下段)。

Propion 酸代謝回路をみると、methylmalonic CoAはisomeraseによつてsuccinyl CoAに転化するが、この際coenzyme B₁₂を必要とすることが知られている。そこでかかる回路から生成される多量のsuccinyl CoAもporphyrin合成に利用されうるのである可能性を想定して、次の実験を行なった。

ウサギ肝臓および網赤血球からmitochondriaを分画し、これを¹⁴C-propionateと培養し、さらにmethylmalonic acid, コハク酸をそれぞれmarkerとして濾紙chromatographyに展開すると、図18の左側に示すようなspotsをえた。

Spots 1, 4はmethylmalonic acidで、spots 2, 5はコハク酸に該当する。それぞれspotsの放射活性をみると(図18の右側)、1, 4は著しく高い活性を示し、2, 5も明らかに高い放射活性を示した。この成績から肝細胞、網赤血球のmitochondriaはpropionateからmethylmalonic acidを経て、コハク酸を産生することが明らかである。また、ウサギ網赤血球のmitochondriaをpropionateまたは α -ketoglutarateと培養し、産生される δ -ALAを測定すると、propionateは明らかに δ -ALAに利用されており、その利用度も α -ketoglutarateに比し、やや低い程度である。

表5. 悪性貧血患者骨髓赤芽球におけるプロピオン酸から δ -ALAの合成

名前	病名	DMBC	Substrate	ALA formed nmole/ 10 ⁶ Ebl
坂○	正常	—	Propionate	1.04
"	"	1 μ g/0.56	Propionate	1.04
中○	正常	—	α -KG	1.20
"	"	—	Propionate	1.10
神○	悪性貧血	—	Propionate	0.00
"	"	1 μ g/0.56	Propionate	0.10
"	"	—	α -KG	0.24
"	(B ₁₂ 投与7日)	—	Propionate	0.37
"	"	—	α -KG	0.61
川○	悪性貧血	—	α -KG	0.85
"	"	1 μ g/0.5	α -KG	0.92
"	"	—	Propionate	0.00
"	"	1 μ g/0.5	Propionate	0.61

DMBC = 5,6-Dimethyl benzimidazol-B₁₂-Coenzyme

以上の基礎的実験の成績をもとに、臨床観察を行なった。正常人骨髓穿刺細胞浮遊液を用いると、propionateから δ -ALAは合成可能でcoenzyme B₁₂の添加を必要としない(表5)。しかも α -ketoglutarateからの δ -ALA合成とほとんど同程度の利用率を示した。悪性貧血患者の骨髓は α -ketoglutarateから δ -ALAを新生するが、propionateからは δ -ALA新生が認められない。しかるに、coenzyme B₁₂を添加するとpropionateは δ -ALAに利用されるようになる(表5)。いずれにしても、本症ではALA合成酵素活性、ALA dehydrase活性が低下しているため、 δ -ALAの新生量は低いが、治療に

図19. 悪性貧血におけるポルフィリン合成能
よって、その活性も次第に回復してくる(図19)。要するに、以上の実験成績は、悪性貧血においても、赤芽球系細胞にporphyrin合成の障害のあることが判明し、とくにpropione酸代謝回路からのheme合成の道を新たに見い出し、本症ではこの道が遮断されている所見を実証しえたことは重要な意義をもつものと考ええる。

III. 解糖中間体の変化とその意義

この方面の研究は一般に日も浅く、赤血球機能との関連において、なお未解決の問題を多く残している。ここには1, 2の病態における所見を述べるにとどめ、詳細な記述は他の機会にゆずる。

赤血球の解糖中間体およびそれに関連するadenine nucleotideを酵素学的に測定するため、解糖過程および補酵素の変動を六つのsteps群に区分

図20. 尿毒症における赤血球解糖中間体

し、それぞれのstepに作用する酵素を添加し、転化する基質の量を計算した。

1. 尿毒症赤血球における解糖中間体

尿毒症赤血球において可成り特徴あるpatternを認めた。すなわち、F-6-Pからtrioseに至るまでの中間体の増加、phosphoenolpyruvateまでの中間体の軽度増加、さらにpyruvate, lactateの著しい減少などであり、またATPの増加も注目すべき所見である(図20)。他方、本疾患における骨髓赤芽球の微細構造の変化を調べるとmitochondriaの変化など想像以上に重篤なものがあり、細胞に影響を及ぼす複雑な外的諸因子の可能性を考慮すると、ここに認めた解糖中間体のpatternが何を意味するかを解明するにはなお今後の研究をまたねばならない。

2. 先天性球形赤血球症

先天性溶血性貧血で解糖系酵素に先天性異常のある病型が発見されているが、先天性球形赤血球症では、酵素系の異常は未だ明確にされていない。球形赤血球症、非球形溶血性貧血などを中心にその赤血球の解糖中間体を検討した。図21にみるように、中間体の全般的な増加、殊にF-6-P、三炭糖の増加がみられ、ATPの増加、ADPもやや増加の傾向を示した。また、これら患者赤血球の諸酵素活性、adenine nucleotide, GSHなどを測定し、正常値に対する百分率で示すと、解糖系

酵素、殊にG-6-PD, pyruvate-kinase, phosphoglyceric kinaseなど増強の傾向を示し、ATPも増加している。GSH, GSSG-reductaseはほぼ正常値を示した。これらの所見から一般に解糖系は活発に回転していると解され、現にこれら赤血球の糖消費は正常の1.4ないし1.8倍に増加している。

Jandlらはすでに先天性球形赤血球症の赤血球にouabainを加えて、Na-K-transportを阻止すると、その糖消費は正常赤血球のそれにほぼ等しくなることから、この糖消費の増加は、赤血球膜のNa-K-transport活性の増加によると考察している。わたくしどもも本症で、同じく糖代謝の亢進像を認めたが、次の項で赤血球膜機能の変化と併せて考察を加える事にする。

IV. 膜機能障害とその臨床

種々な病態で赤血球膜のactive transportを測定し、それぞれ興味ある所見をえたが、ここでは、先天性球形赤血球症と重症筋無力症の赤血球についてのみ述べる。測定法は⁸⁶Rb法を用いた。赤血球の50%浮遊液を作成し、ouabainを含むものと含まないもので、30分解置後の⁸⁶Rbの赤血球への摂取量の差から、Na-K-active transportを計算した。

1. 溶血性貧血

先天性溶血性貧血ではactive transportが亢進しているが、elliptocytosisの1例では低下している

図21. 溶血性疾患における赤血球解糖中間体

図22. 赤血球の陽イオン能動輸送 (先天性溶血性貧血)

表6. 先天性球形赤血球症における赤血球膜 ATPase 活性 ($\mu\text{moles Pi/hr/10}^9$ RBC)

		Total	Mg-ATPase (%)	Na-K-ATPase (%)
Mg*	対	1 0.797	0.601 (75.5)	0.196 (24.5)
		2 0.970	0.665 (68.7)	0.305 (31.3)
		3 0.221	0.182 (82.5)	0.039 (17.5)
	差	1 0.545	0.123 (22.2)	0.422 (77.8)
		2 0.845	0.140 (16.6)	0.705 (83.4)
		3 0.409	0.156 (38.2)	0.257 (71.8)
Mg*	対	1 0.283	0.193 (68.5)	0.090 (31.5)
		2 0.252	0.168 (66.7)	0.084 (33.3)
		3 0.273	0.179 (65.4)	0.094 (34.6)
	差	1 0.370	0.027 (7.4)	0.343 (92.6)
		2 0.155	0.038 (24.6)	0.117 (75.4)

(図22). Jandlらも先天性球形赤血球症ではNa K transportは正常の1.5倍にもたかまつていと報告しているのと同様一致する。

そこで、20mOsm. 磷酸緩衝液 (pH 7.4) を用いて、赤血球を溶血し遠心法で膜成分を調成し、基質としたATPから遊離する無機リンを測定して、そのATPase活性を求めた。その際ouabainで阻止される分の活性がNa, K-ATPaseに該当する

図23. 先天性球形赤血球症における赤血球膜のATPase 活性

ので、全活性との差はMg-ATPaseとみなしうる。

先天性球形赤血球症の赤血球膜の全ATPase活性が正常赤血球のそれと有意の差を示しているか否かは、まだ決定的に結論しえないが、低下の傾向が窺われる(表6)。しかし、Mg-ATPase活性とNa-K-ATPase活性との比率が著しく変化して全例逆転を示していることは明白である(図23)。すなわち、本症赤血球ではNa, K-ATPase活性が著しく強く、Mg-ATPaseが弱い。そのためにNa-K transportが亢進し、それに消費されるATPの補給のために解糖系が活発に回転することが一応理解される。しかし、他方Mg-ATPase活性の低下をどう解釈すべきかが重要な問題である。近年、赤血球膜には筋肉におけると類似の収縮蛋白の存在が証明され、Mg-ATPase作用によつて収縮し、赤血球本来の形態を保持するものと理解されている。Jandlらが主張するように、本症病態の本質がactive transportの異常な亢進にあるのか、それとも収縮蛋白—Mg-ATPase系の異常にあるのか、さらに今後の観察症例を重ねた上で結論をくだす必要があると考えるが、上述のdataから、むしろ後者の可能性が強く推論される。すなわち、赤血球の球形化には、収縮蛋白—Mg-ATPase系の機能異常がより直接的な関連をもつと考えるからであ

る。

他方、赤血球膜のリン脂質の異常に本症の本態があると主張し、lysophosphatidyl ethanolamineの増加を指摘する研究者もある。本症赤血球膜のリン脂質をFolch法で抽出、薄層chromatography法で分析し、photodensitometry法で定量した。その結果、正常赤血球膜に比してlysophosphatidyl ethanolamineの増加を認めた。しかし、その意義については観察症例も少なく、測定操作上の問題をも含めてなお今後の検討を俟つ必要がある。

2. 重症筋無力症

本症の治療に抗cholinesterase剤を使用すると、赤血球のactive transport活性は例外なく低下してくる。いま、正常赤血球に種々濃度のDFPを作用させると、赤血球のcholinesterase活性はほとんど零になる。10⁻⁸Mol位の所から、赤血球膜のactive transportは低下し、また、total ATPase活性も低下し、殊にNa, K ATPaseは零に低下する。このように処理した赤血球も、治療中の重症筋無力症の赤血球も形態学的に異常を示さないし、また酸抵抗も虚弱とはならない。

この事実は、特発性夜間血色素尿症の病因として赤血球のcholinesterase活性低下が注目されているが、cholinesterase活性の低下のみが溶血の原因となるとは解しにくい成績をえた。

V. 還元機構の障害とその臨床

Porphyrin生合成の過程は強い還元状態で進行するし、赤血球内で血色素も酸化をまぬかれてその機能を保持するには強い還元力に保護される必要がある。赤血球に備わる還元能として次の如き機構がある。

- ScottによるDPNH (NADH₂) に依存するdiaphorase活性
- HuennekensによるTPNH (NADPH) に依存するMet-Hb-reductase活性
- TPNHに依存するGSSG-reductase活性
- その他に、catalase, GSH, GSH-peroxidaseなどもあり、またascorbin酸, ergothioneine, DPNH, TPNHなど、酸化性物質に対抗して赤血球

を保護する作用がある。

1. 臍帯血

胎児赤血球の血色素はglobin組成の点で成人赤血球と異なり、これはHb-Fと特によばれているが、また胎児赤血球は成人と異なり赤血球に比して亜硝酸ソーダーで酸化されやすいといわれる。しかし、臍帯血のMet-Hb含量は、正常成人の血液に比して、決して多くはない。

Scottの方法によつて、臍帯血赤血球のDPNH-diaphorase活性を測定すると、例外なく低値を示した。しかし、この値は生後1カ月以内に成人赤血球の値の範囲になった。

また、臍帯血赤血球を亜硝酸ソーダーで、完全にMet-Hbに変化させ、pH 7.4の緩衝液中に孵置して、血色素が還元Hbに還元される速度を測定し、DPNH diaphorase活性との相関を求めると、成人赤血球に比して、臍帯血赤血球のMet-Hbの還元能はDPNH-diaphorase活性により強く依存する傾向がうかがわれる(図24)。GSSG-reductase活性はやや強いが、GSHは成人赤血球のそれと有意の差を示さない。catalase活性はやや低値を示し、TPNH-Met-Hb reductase活性は成人赤血球のそれと大差を認めない。G-6PD活性が増強しており(図25)、その結果、多量に産生されるであろうTPNHが何らかの形で還元能に関与する可能性も想定される。臍帯血赤血球のDPNH-diapho-

図24. 正常成人赤血球および臍帯赤血球のメトヘモグロビン還元速度とDPNH diaphorase 活性

図25. 臍帯血の赤血球還元活性

表7. 臍帯血における易酸化性
—アセチル・フェニルヒドラジンによるハインツ小
体試験—
ハインツ小体5個以上を有する赤血球百分比

	前	2時間	4時間
正	1) 0 %	14.0 %	15.4 %
常	2) 0	18.5	26.2
	3) 0	15.0	22.4
臍	1) 0	61.6	97.0
帯	2) 0	72.4	98.0
血	3) 0	81.0	93.2
	4) 0	60.4	91.2

ase活性は未だ十分に発達していないと解されるが、よく機能を発揮してMet-Hbの蓄積は認められない。しかし、G-6PD活性の高いこと、GSSG-reductase活性が高い傾向にあることを除けば、酸化性物質に対するその他の防衛の諸因子が成人赤血球に比して、特に強いという積極的な所見は見出しえない。したがって、臍帯血赤血球は酸化性物質に曝されると抵抗は甚だ弱いものと想像される。現に、acetyl phenylhydrazineによるHeinz小体試験を行なつて、成人赤血球のそれと比較すると、臍帯血赤血球は酸化に対する抵抗が弱く、Heinz小体の出現率が著しく高いことを認めた(表7)。要するに胎児赤血球は酸化性物質に対する抵

抗の虚弱であることを、改めて銘記しなければならない。

2. 慢性チアノーゼ赤血球の還元能

Fallot四徴12例の赤血球と正常人16例の赤血球につき血色素量と酸素抱合能との相関を調べたが、両者の間に差を認めない。G-6PD活性が若干高値を示したが、GSSG reductase, GSH, DPNH-diaphorase活性などには正常赤血球と有意の差を認めない。慢性チアノーゼ赤血球血色素はMet-Hbになり易いという従来の考え方を支持する証処はえられなかつた。

3. 糖尿病性白内障と赤血球還元能

目のlensと赤血球とは代謝の面で類似性が多い。赤血球はpentose monophosphate回路よりTPNHを産生し、GSSG-reductaseによりGSHを多量に保持して、酸化性物質に対抗し、Heinz小体のような変性沈殿物の出現を防止している。これと同様な意義でlensはpentosemonophosphate回路、sorbitol回路から多量のTPNHの供給をうけ、高濃度のGSHを保持し、酸化性物質に対抗し、不溶性蛋白albuminoidの変性沈着を防止し、その透明度を維持するものと理解されている。

糖尿病患者赤血球のG-6PD活性、GSH、GSSG-reductase活性を測定し、白内障のあるものとなないものとのわけて整理すると、図26に示すように、

図26. 糖尿病赤血球の還元活性

白内障をもつ群ではG-6PD活性が高く、GSSG-reductase活性も高い傾向を示した。lens自体のこれら酵素活性は未だ測定していないので推論の域を脱しないが、赤血球のG-6PD欠乏の黒人でlensのG-6PDも欠乏しているというような文献的事実を参照すると、lensにも同じ傾向のdefence mechanismの活性の動きがあるものと解される。ちなみに、老人性白内障の赤血球では、白内障をもたない老人赤血球と何ら相異を示さなかつた。糖尿病における白内障の発現機序と赤血球代謝異常との関連性は、今後なお追究さるべき興味ある問題である。

4. 特発性Met-血色素血症

血色素が蛋白構造上の異常で酸化されやすく、慢性チアノーゼを呈する疾患にHb-M症があるが、ここに取り上げるのは、Met-Hbを還元する機構に先天性異常のある疾患である。自験症例の検索成績を中心に、本症の病態を述べる。

患者は沖縄出身の25才の男子大学生で、幼少時より顔色が悪く、心房中隔欠損と診断されていた。皮膚はどす黒く、口唇粘膜の血管はチョコレート色をおびており、軽度の赤血球増加を示したが、心臓をはじめ諸臓器には異常を認めない。

赤血球hemolysateを作成し、spectrophotometerで検査すると634mμの所にpeakを示し、Met-Hb

患者 : 0.082 ΔO.D./min./gr Hb/ml
 Trait : 1.73 ~ 2.15 ΔO.D./min./gr Hb/ml
 正常 : 3.13 ~ 4.58 ΔO.D./min./gr Hb/ml

図27. DPNH diaphorase活性

の吸収に一致する。cyanhemoglobinにするとこのpeakは消失する。なお、殿粉gel電気泳動像、酸素解離曲線などの点からもHb-Mでないことは明らかである。血液中のMet-Hb量は常に30%前後である。

赤血球の解糖中間体、関連酵素活性などには著しい変化はみられない。ただ、ATP値がやや低値を示し、また、GSSG-reductaseおよびLDHがやや低値であるが、病態に関連しては特別の意義をもたないと考える。なお、赤血球を³²P磷酸と孵置して後にformate columnを用いて酸可溶性リン酸化化合物を分画し、その放射能を測定すると、ATP、その他リン酸化化合物の量、放射活性ともにほぼ正常範囲にあつて、このMet-Hb血症は解糖系の異常によるものではないことが明らかである。

次に、Scottの方法に準じて、DPNH-diaphorase活性を測定すると、図27に示すように、患者赤血球では2,6 dichlorophenol indophenolの還元がほとんどみられない。正常人2名と叔父、いとこの

図28. DPNH-diaphorase活性に対するリン酸効果

計4名の赤血球の還元能に比して、母親と一人の兄とは丁度中間の値を示した。

また、TPNH-Met-Hb reductase活性を測定したが、正常人赤血球とほとんど差が認められない。おそらく、TPNH-Met-Hb reductaseには変化がないものと解される。

以上の検査成績から、本症は特発性Met-Hb血症と診断した。

次に、図28に示すように、本患者の赤血球hemolysateが、DPNHの存在のもとで、2-6-dichlorophenol indophenolを還元する能力がリン酸イオン強度を増すにつれて、正常人赤血球hemolysateの還元能に近づいてくる所見は注目すべき事実である。すなわち、本症例でのDPNH-diaphorase活性の低下はenzyme defectというよりは、むしろ広義のenzyme anomalyと解すべきではないかと考える。特発性Met-Hb血症の症例がすべてこのような型であるのか、真の意味でのenzyme defectの型のものもあるのか、さらに別の家系の症例を重ねて検討する必要がある。

沖縄に出張して、本患者の家系を調査した。そのうち33例につき赤血球のDPNH-diaphorase活性を測定した結果、父方の祖母と父の同胞に1例、母親とその同胞に1例、患者の同胞に患者を含めて4例、合計8例にDPNH-diaphorase活性の異常を見出した。うち臨床的な症状を呈しているのは2例で、うち1名は血液検査をしていないが、症状からはほぼ確実視される。他の6例はtraitである。従って、遺伝様式は一応、常染色体劣性遺伝と考えられる。

本症の治療には、古くからmethylen blue, ascor-

bin酸などが用いられてきた。本症例でも、1% methylen blueを20mg注射し、次いで100mg点滴注入すると、流血中のMet-Hb量は急速に減少し、赤血球hemolysateの色調は次第に正常に近づく。しかし、治療中止後10日位でMet-Hb量はほとんど前値に戻る。

Ascorbin酸1,000mg注射するとMet-Hb量は急速に減少し、そのあと1,200mgを連日経口投与するとMet-Hb量を10%位に維持することができる。また、vitamin K₁1日量100mgを経口投与してもMet-Hb量を低下せしめておくことができる。

VI 結 語

「赤血球の臨床」という広範な内容の問題を課せられ、当初この問題をどう整理して検討したらよいかに迷った。しかし、結局は赤血球を機能的な面から観察して、その異常と臨床との関連性に検討を加えようとする立場をとった。

かえりみると多くの点に、未解決の問題を残し、むしろ今後の研究の糸口をさぐりあてた程度の内容にとどまったところもあった。ただ、この中に今後の血液学が進むであろう一つの方向なり、考え方なりの一端でも賢察願えれば、それこそ演者の望外の喜びとする所である。

終りに、本講演の機会を与えられた会頭山岡憲二先生、理事長沖中重雄先生ならびに幹部の諸先生に心から感謝の意を表し、また北村精一、吉川春寿、水上茂樹、浅倉稔生、勝沼晴雄、鈴木継美、中尾真、小宮正文、山川民夫、浦田郡平、山村雄一、武内望、菅野晴夫、嶋谷亮一、前川正、浅井一太郎、三輪史朗の諸先生方の御援助に深謝する。

文 献

- 1) Bannerman, R.M., Grinstein, M. and Moore, C.V.: Hemoglobin synthesis in thalassemia: In vitro studies. Brit. J. Haemat., 5 : 102, 1959.
- 2) Barnes, L.A., Young, D.G., Mellmann, W.J., Kohn, S.B., and Williams, W.J.: Methylmalonate excretion in a patient with pernicious anemia. New Engl. J. Med., 268 : 144, 1963.
- 3) Boyett, J.D. and Butterworth, C.E. Jr: Lead poisoning and hemoglobin synthesis, Report of a study of fifteen patients with chronic lead poi-

- soning. Amer. J. Med., 32 : 884, 1962. —4) Brown, E.G.: Evidence for the involvement of Ferrous iron in biosynthesis of δ -ALA by Chicken erythrocyte preparations. Nature, 182 : 313, 1958. —5) Burnham, B.F. and Lascelles, J.: Control of porphyrin biosynthesis through a negative feedback mechanism. Studies with preparations of δ -ALA synthetase and δ -amino levulate dehydrase from *Rhodospseudomonas spheroides*. Biochem. J., 87 : 462, 1963. —6) Chisolm, J.J.: Disturbances in the biosynthesis of heme in lead intoxication. J. Pediat., 64 : 174, 1964. —7) Flavin, M., Ortiz, P.J., and Ochoa, S.: Metabolism of Propionic acid in animal tissues. Nature, 176 : 823, 1955. —8) Georgiev, G.P. and Lerman, M.I.: Separation and some properties of distinct classes of newly-formed ribonucleic acid animal cells. Biochim. biophys. Acta (Amst.), 91 : 678, 1964. —9) Goldwasser, E., White, W. F., and Taylor, K.B.: Further purification of sheep plasma erythropoietin. Biochim biophys. Acta, 64 : 487, 1962. —10) Granick, S. and Mauzerall, D.: Enzymes of Porphyrin-synthesis in red blood cells. Ann. N.Y. Acad. Sci., 75 : 115, 1958. —11) Gurnani, S., Mistry, S.P. and Johnson, B.C.: Function of Vitamin B₁₂ in methylmalonate metabolism 1. Effect of cofactor form of B₁₂ on the activity of methylmalonyl-CoA isomerase, Biochim. Biophys. Acta, 38 : 187, 1960. —12) Jacob, H.S., Jandl, J.H., Bell, S.C. and Files, N.M.: Increased cell membrane permeability in the pathogenesis of hereditary spherocytosis. J. clin. Invest., 43 : 1704, 1964. —13) Labbe, R.F.: An enzyme which catalyzes the insertion of iron into protoporphyrin. Biochim. Biophys. Acta (Amst.), 31 : 589, 1959. —14) Lengyel, P., Mazumder, R. and Ochoa, S.: Mammalian methylmalonyl isomerase and Vitamin B₁₂ CoA. Proc. nat. Acad. Sci (Wash.), 46 : 13120, 1960. —15) London, I.M., Bruns, G.P. and Karibian, D.: The regulation of hemoglobin synthesis and the pathogenesis of some hypochromic anemias, Medicine, 43 : 789, 1964. —16) 水上茂樹: 赤血球の解糖の調節, 蛋白質・核酸・酵素. 10 : 716, 1965. —17) Nakao, K., Kimura, K., Miura, Y. and Takaku, F.: Erythrocytosis associated with carcinoma of the liver (with erythropoietin assay of tumor extract) Amer. J. med. Sci., 251 : 161, 1966. —18) Scott, E.M.: The relation of diaphorase of human erythrocytes to inheritance of methemoglobinemia. J. clin. Invest., 39 : 1176, 1960. —19) Steiner, M., Boldini, M., and Damesheck, W.: Enzymatic Defects of Heme synthesis in thalassemia. Ann. N.Y. Acad. Sci., 119 : 548, 1965. —20) Zinkham, W.H.: Deficiency of glucose-6-phosphate Dehydrogenase activity in lens from Individuals with primaquine-sensitive erythrocytes. Bull. Johns Hopk. Hosp., 109 : 206, 1961.