肝臓の造血成分に関する研究 第5報 肝臓の高空耐性増強成分と造血成分との関係*

富山哲夫・矢吹耀男・米 康夫

(九州大学農学部水産化学教室)

Studies on the Antianemic Ingredient of Liver—V.

A Similarity between the Antianetic Ingredient and a Liver Component Effective to Fortify the Tolerant Capacity for High Altitude

Tetuo TOMIYAMA, Teruo YABUKI and Yasuo YONE

Estimations have been made of the tolerant capacity for high altitude of various purified fractions of cattle liver by taking the following items as a criterion of effectiveness, namely, total fluctuation in red blood cell count, and survival period during repeated exposure to low pressure.

It has been found that the active ingredient can be adsorbed by the active carbon from slightly acidic medium, but not by the acid clay (Fig. 1 and 2); that it can be precipitated by phosphotungstic acid, but not by basic lead acetate (Figs. 3, 4 and 7); and that it is soluble in 70 per cent ethanol, but seems to be insoluble in 90 per cent ethanol (Figs. 5 and 6).

The results of this study lead to the conclusion that the active ingredient under study may be most likely similar to one of the antianetic ingredients contained in liver.

I. 緒 言

著者等は第4報¹⁾に於て、肝抽出物を経口投与したマウスは無投与区に比して約2倍の低圧負荷時間に耐えることを明かにし、また肝抽出物を経口投与した白鼠は毎日低圧を繰り返して負荷されても尾部静脈血の赤血球数に於て僅少の変動しか示さないことを確かめた。之等の結果から高空耐性附与の機作について論考し、肝の高空耐性増強物質は血球造成と密接な関連をもつものと推察した。

本研究ではこの推察を更に確かめる目的で、肝の高空耐性増強物質の分別精製を試みた結果、有効物質は肝の造血成分と同一或は類似物質と考えられるに至つたので、ここにその結果を報告する。

II. 実 験 方 法

赤血球数の変動をみる実験にはラッテを用い、魚粉 22, 菜種油 10 (肝油 1% を含む), 小麦澱粉 60, マツカラム塩 3, 酵母 5 より成る合成飼料で飼育し、正常成長を示すもののみを選んだ。試験区の動物は、前記の合成飼料に供試試料を混合したもので数日間予備飼育した後、低圧負荷試験に供した。低圧負荷には気圧自動調節式低圧負荷装置¹⁾を用い、毎日 2~6 時間 7000m 相当の低圧に曝した。赤血球数の測定には、Thoma-Zeiss Haematometer を使用し、血液は尾部の静脈をカミソリ刃で切断することにより溢出した

1951年9月15日受理

* 九州大学農学部水産学教室業績

ものを用いた。試験前少くとも2回計数し変動の少いことを確かめてから低圧負荷を開始した。試験中に於ける赤血球の測定回数は採血による影響を避けるために、2~4日おきに計数し、この計数日には低圧は負荷しなかつた。

他方、低圧負荷による致死時間の測定には、赤血球変動試験終了後のラット或はマウスを用いた。マウスの場合には前記の合成飼料に供試料を混和したもので数日間予備飼育した後、毎日2~7時間、9000m. 相当の低圧(230mm 水銀柱相当圧)を負荷し、その間の致死時間を測定した。なお低圧負荷の速度は5分間に230mm Hgの気圧となるように調節した。

Ⅲ. 結 果 及 び 考 察

A. 高空耐性増強物質の濃縮

肝の高空耐性増強物質を分離濃縮する方法としては、造血成分との関係を明かにする目的から、造血成分の濃縮に屢々用いられる活性炭処理方法を適用せんとし、先ず有効物質が微酸性で活性炭に吸着されるや否やについて吟味を試みた。

牛肝臓を肉挽器にてよく粥状とし、之に適量の湯を加え、稀塩酸を少量加えてpH 4.5とし、50~55°Cに数時間放置した後、濾過した。濾液をpH 2.5に調節し、之に4%の活性炭或は酸性白土を加えて30分間振盪した後、濾液と吸着部とに分別し、吸着部は更にn-アソモニヤを含む50%エタノールで溶出した。かようにして得た活性炭吸着物、酸性白土吸着物及び非吸着物について低圧負荷試験を行つた。即ち180~250gのラッテー尾当り新鮮肝10gに相当する各試料

Fig. 1. The effect of a daily exposure to 7000m. altitude on fluctuation in r.b.c. count of venal blood of adult albino rats receiving active carbon-adsorbate, active carbon-filtrate and acidclay-adsorbate.

Fig. 2. Survival period after a daily exposure to 9000m. altitude of adult mice receiving three fractions given in Fig. 1. Temperature ranged from 13.5° to 19.5°. Temperature-rise after exposure amounted to 1.5~4.0°.

を毎日授与し、低圧負荷期間中の赤血球数を測定し、また成長したマウスには一尾当り新鮮肝0.2gに相当する各試料を毎日経口的に与えて低圧負荷期間中の生存時間を測定した。

結果は Fig. 1. 及び Fig. 2. に示すように、試料を授与していない対照区及び酸性白土吸着物授与区は赤血球数の総変動が500~600万と大きく、活性炭吸着物授与区はその変動が150万で最も小であつた。非吸着物授与区は第四回目の測定前の低圧負荷中に死亡したので、赤血球変動値として不完全ではあるが、その変動は比較的小さいようであつた。マウスの致死時間では、肝の分割区分の授与量が少かつたことと、実験に供した尾数が少かつたので明瞭を欠くが、活性炭吸着区が他のいずれの区よりも長時間の低圧負荷に耐えたこととはうかがわれる。本実験に於て活性炭吸着区が多少有効性を示したのは、造血成分の定量的吟味の研究に於て後報するように、メチレン青の相対的吸着能100及び65の二種の活性炭を5%使用してえた吸着部の造血力価がそれぞれ1.7及び0.75を示した結果から推察して、ここに使用した活性炭の性能が悪く相対的吸着能70のものであつたことに起因するものと思われる。要するに以上の実験から肝の高空耐性

増強物質は造血成分と同様に、微酸性で活性炭に吸着されることが明かとなった。

B. 高空耐性増強成分の精製

造血成分の精製法に倣つて本有効成分の精製を試み、精製途中にえられる各区分の効果について実験した。

(1) A 項に示した方法によつて牛肝の抽出物と残渣 (R) とに分離した後、抽出部 (1.35kg 生肝相当) を 750cc の 20% 溶液とし、硫酸で pH 4 とし、活性炭白土 20g を加え振盪後一夜放置濾過し、濾液に活性炭 40g を加え一時間攪拌後濾過し、濾液 (CF) を分別した。活性炭吸着部は n-アモニヤを含む 50% エタノール 2l で溶出し、溶出液はバリタで pH 9 とし減圧濃縮してアモニヤを除き、次に硫酸を加えてその濃度を 5% とし濾過し、燐タングステン酸の 5% 硫酸液を加えて生ずる沈澱 (PPC) と濾液 (PFC) とを分別し、両区ともそれぞれバリタを加えて燐タングステン酸を除いた。生物試験には R 区、CF 区、PPC 区 及び PFC 区を 80~120g のラッテ一尾当り新鮮肝 5g に相当する量だけ毎日飼料に混合して投与し低圧負荷による赤血球数の変動をみた。この試験が終了してから、更に之等の白鼠を用いて 9000m. の低圧に於ける致死試験を行つた。

Fig. 3. The effect of a daily exposure to 7,000m. altitude on fluctuation in r.b.c. count of venal blood of growing albino rats receiving liver residue (R), active carbon-filtrate (CF), phosphotungstate fraction (PPC) and phosphotungstate-filtrate fraction (PFC). Temperature of the expt. ranged from 29° to 31°C.

Fig. 4. Survival period in min. on exposure to 9,000m. altitude of the albino rats after ending the experiments given in Fig. 3.

実験結果は Fig. 3. 及び Fig. 4. に示した。対照の無投与区では、白鼠尾部静脈の赤血球の総変動数は 240~320 万、致死時間は 60~70 分であつたのに対し、R 区は変動 180~500 万、致死時間 55~85 分で無効、CF 区は変動 350~440 万、致死時間一尾は 45 分、一尾は 90 分の負荷に耐えている程度で効果は極めて僅少であつた。PPC 区は変動 250~1150 万、致死時間は無投与区が 80~125 分であつたのに対し 90~130 分で無効、PPC 区はこれらに反し変動 160~240 万であり、低圧負荷 180 分に達してもなお生存を続けた。かように有効成分は造血成分と同様に²⁾、活性炭吸着物中の燐タングステン酸沈澱部に全部集ることが明かとなった。しかし活性炭には吸着されないで、葉酸及び B₁₂ 以外の成分と思われる。

(2) 造血成分との関係を更に明瞭にする目的で、COHN³⁾ のアルコール分割法を加味して次のような精製法を実施してみた。A 項に記したと同様にしてえた肝抽出物に無水エタノールを加えて 70% とし、凝固物を除いて後、更にエタノールを添加して 90% とし生じた沈澱物を集め、水に溶解し、バリタを加えて pH を 8 に調整してから塩基性醋酸鉛を加えて生ずる沈澱を除いた。濾液には硫酸を加えて鉛を除き、更に硫酸濃度を 5% とし、次に燐タングステン酸の 5% 硫酸溶液を加えて生じた沈澱を濾別し、沈澱及び濾液にそれぞれバリタを加えて燐タングステン酸を除き、更に硫酸を加えて過剰のバリウムを除去した。かくして得た各区分、即ち 70% エタノール凝固部 (70 EP)、90% エタノール可溶部 (90 ES)、燐タングステン酸

沈澱物 (PPA) 及び磷タングステン酸濾液 (PFA) を 90~120g の白鼠一尾当り新鮮肝 5g に相当する量だけ毎日飼料に混合して投与しつゝ、低圧負荷による赤血球数の変動並びに致死時間を測定した。

Fig. 5. Effect of a daily exposure to 7,000m. altitude on fluctuations in r.b.c. count of growing albino rats receiving 70% ethanol insoluble (70EP), 90% ethanol soluble (90ES), phosphotungstate precipitate (PPA) and phosphotungstate filtrate (PFA). Temperature of the expt. ranged from 27° to 29°C.

Fig. 6. Survival period in minute on exposure to 9,000m. altitude of the albino rats after ending the experiments given in Fig. 5.

Fig. 5. から明かなように、対照の無添加区、PFA 区、70 EP 区 及び 90 ES 区 では赤血球数の変動はそれぞれ平均 650 万、360 万、420 万及び 520 万と大きかつたが、PPA 区では赤血球数の変動は 180 万と遙かに小さかつた。また Fig. 6. にみられるように、対照区の致死時間が 90~180 分であつたのに対し、PFA 区は 180~200 分であり、PPA 区は 240 分間の負荷後にも生存していた。また対照区の致死時間が

Fig. 7. Survival period of adult mice receiving subcutaneous administration of the phosphotungstate fraction obtained from active carbon-eluate (PPC) and from 90% ethanol insoluble (PPA).

50~70 分の場合に、70EP 区は 90 分、90 ES 区は 90 分でもなお生存していた。この実験の範囲では有効成分が 90% エタノールに可溶であるかは不明である。しかし 90% エタノール不溶部より分離した PPA 区が顕著な効果を示すことから判断すると、有効成分の大部分は 90% エタノールに不溶とみてよいと思う。

以上の吟味によつて磷タングステン酸沈澱物が最も有効であることを知つたが、更に之を確証する意味からマウスの致死試験を行つた。試料は 12~19g のマウス一尾当り新鮮肝の 1g 相当量を毎日皮下注射しつゝ低圧負荷を繰り返した。Fig. 7. から明かなように、活性炭吸着部を磷タングステン酸で沈澱した PPC 区も、また 90% エタノール不溶部を磷タングステン酸で沈澱した PPA 区も、共に無添加区に比して遙に長時間の低圧負荷に耐

Ⅶ. 総 括

肝臓に含まれる高空耐性増強成分の分別精製を試みた結果、該成分は次に示すように造血成分と類似の性質をもつことが明かとなつた。

1) 肝臓中の有効成分は微酸性で活性炭に吸着され、アンモニア性アルコールで溶出される。活性白土によつては吸着されないで、葉酸及びビタミン B₁₂ と異なる有効成分であろう。

2) 70% エタノールには可溶であり、90% エタノールには難溶である。

3) 塩基性醋酸鉛によつては沈澱されないが、燐タングステン酸によつては沈澱される。

終りに臨み、実験に助力された藤野義彦、中尾しづえ、及び志賀たかの諸氏に深謝の意を表する。なお本研究の一部は文部省科学研究費によつて行つたものである。

文 献

- 1) 富山哲夫, 矢吹耀男, 米 康夫: 日水会誌 **18**, 299 (1953).
- 2) COHN, MINOT, ALLES and SALTER: *J. Biol. Chem.*, **77**, 325 (1928).
- 3) COHN, MINOT, FULTON, ULRICH, SARGENT, WEARE and MURPHY: *J. Biol. Chem.*, **74**, XIX (1927).