

ヘモグロビン合成に関する研究

I. 末梢血液の Reticulocyte の濃縮について

川崎医科大学 生化学

原 野 昭 雄

同 検査診断学

岡田美恵子, 上田 智

同 内科

柴 田 進

(昭和54年5月7日受付)

Studies on the Hemoglobin Biosynthesis.

I. On the Concentration of Reticulocytes from Peripheral Blood.

Teruo Harano

Department of Biochemistry, Kawasaki Medical School.

Mieko Okada and Satoshi Ueda

Department of Clinical Pathology

Susumu Shibata

Department of Medicine

(Accepted on May 7, 1979)

低含量 reticulocyte 血液から集められた赤血球を冷室 (8°C) 中, 30 分間, 高速遠心 (最高遠心力: 15,600 × G) することにより約 10 倍に濃縮された reticulocyte rich red cell を回収することができた。正常人あるいは非貧血性患者のヘモグロビン合成研究にこの操作によって得られた reticulocyte rich red cell は有効なものであった。

Reticulocyte rich red cells concentrated to about ten-fold was recovered by centrifuging the red cells from normal and nonanemic bloods consisting lower reticulocyte percentages (<1%) in the cooling chamber at 8°C at 15,600 x G (maximum) for 30 min. The reticulocyte rich-red cells collected by this treatment proved to be useful for the hemoglobin synthesis of blood from normal and/or nonanemic individuals.

はじめに

正常人の末梢血液中の reticulocyte は通常 1% 以下であり, 正常人あるいは非貧血性患者

血液の生化学的研究 (例えばヘモグロビンの合成研究) を行なうには高濃度の reticulocyte を含む赤血球の回収が困難なことが大きな障害となっている。reticulocyte rich red cell を

得る手段として以前から行なわれている方法に phosphate esters¹⁾, ficoll²⁾, bovine serum albumine³⁾, regnografin^{4,5)}, や dextran T 40⁶⁾ を用いた密度勾配遠心法が応用されてきた。これらの方法によって得られた reticulocyte rich red cell は直接 amino acid mixture 中でのヘモグロビン合成研究に応用することはできず高密度媒体を取り除く必要がある。また、血液採取後はできるだけ短時間内に合成研究を進めることが望ましい。我々は細長い遠心管（直径 0.4 cm × 長さ 4 cm, 内容量 400 μ l）を用い高速遠心（最高遠心力：15,600 × G）することにより正常人血液中の reticulocyte を約 10 倍に濃縮でき、ヘモグロビン合成研究に有効であったので報告する。

実験材料および方法

血液：heparin 加に約 5 ml 採血した末梢血液を使用した。

洗浄用生理食塩水：130 mM 塩化ナトリウム—5 mM 塩化カリウム—7.4 mM 塩化マグネシウム溶液を用いた。

リン酸緩衝液：合成ヘモグロビンのカラムクロマトグラフィー用溶出液としてつぎの 3 種の緩衝液を調製した。この際 pH はすべてリン酸で 6.8 に調節した⁷⁾。

Buf. I.: 50 mM メルカプトエタノール, 8 M 尿素を含む 5 mM リン酸二ナトリウム溶液。

Buf. II.: 50 mM メルカプトエタノール, 8 M 尿素を含む 10 mM リン酸二ナトリウム溶液。

Buf. III.: 50 mM メルカプトエタノール, 8 M 尿素を含む 2.5 mM リン酸二ナトリウム溶液。

reticulocyte の濃縮：heparin 加に採血した約 5 ml の末梢血液を生理食塩水で洗浄, 3,000 rpm で 5 分間遠心, 血漿, 白血球層を十分取り除き赤血球を集めた。この操作を 3 回くり返しおこない約 2 ml の赤血球が回収できた。細長い小遠心管（直径 4 mm × 長さ 4 cm, 内容量 400 μ l）に分注し, 冷室（8°C）中 Eppendorf 遠心分離器 5412 型（最大遠心力：15,600 × G）で 30 分間遠心し, packed cell 上

層部から約 10% のところまでを reticulocyte rich red cell として集めた (Fig. 1)。この cell をつぎのヘモグロビン合成実験に用いた。

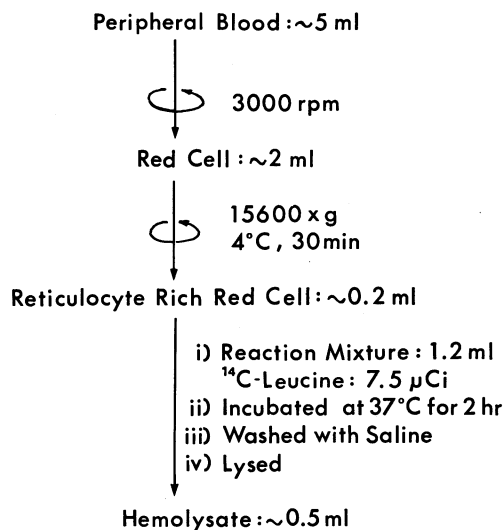


Fig. 1 Procedure of the concentration of reticulocytes from the peripheral blood and of the biosynthesis of hemoglobin

reticulocyte 数の測定：採血後の末梢血液中および濃縮操作後の reticulocyte 数の測定はニューメチレンブルー染色法⁸⁾で行ない, reticulocyte 数 (%) は血球数 1,000 個中に含まれる reticulocyte の数を測定し, パーセントで表わした。

ヘモグロビンの合成および分析：

ヘモグロビンの合成：ヘモグロビン合成実験は上記 reticulocyte rich red cell を用い Lingrel と Borsook らの方法⁹⁾にしたがって行なった (Fig. 1)。reticulocyte rich red cell (0.2 ml) を reaction mixture (amino acids mixture) (1.2 ml) に加え, 37°C で 10 分間 preincubation を行ない, ついで ¹⁴C-ロイシン (0.15 ml, 7.5 μ Ci) を加え同温度で 2 時間 incubation を行なった。約 5 倍量の生理食塩水を加え, 洗浄, 3,000 rpm 5 分間の遠心により合成ヘモグロビン血球を集めた。この操作を 5 回以上くり返し行ない十分洗浄するようにつとめた。reticulocyte 溶血液は血球の 2 倍量の蒸留水, 1/2 量の四塩化炭素を加え振盪後,

3,000 rpm, 15分間遠心し, 溶血液層を分離した. この合成実験からは reticulocyte 溶血液約 0.5 ml が調製できる.

合成ヘモグロビンの分析:

(1) グロビンの調製: 合成ヘモグロビン溶血液を水で約3倍に希釈し, 氷冷下で1%塩酸-アセトン(希釈溶血液の30~50倍量)中に滴下, 脱ヘムシグロビンとした. 生成グロビンは遠心により分離・回収し1%塩酸-アセトンで1回, 冷アセトンで3回洗浄し, アルカリの入った真空デシケーター中で一夜乾燥した.

(2) CM セルロースカラムクロマトグラフ法によるグロビンの分析⁷⁾: 約10 mg のグロビンを0.5 ml の Buf. I に溶かし平衡化した. Buf. I で平衡化したCMセルロース(CM 23, ワットマン製)をカラム(直径0.6 cm × 長さ15 cm)に充填し, 樹脂の高さを9 cm に調節した. ペリスタルチックポンプ(ギルソン製)で流速を0.3 ml/min に調節し, 先に Buf. I で平衡化したグロビン溶液をカラム上層部に重層

した. ついで Buf. II (30 ml) と Buf. III (30 ml) を並列に連結し, Na⁺ 勾配によりβ-鎖グロビン(γ-鎖グロビンも含まれる)を溶出し, さらに Buf. III でα-鎖グロビンを完全に溶出した⁷⁾ (Fig. 2). 各tube 中に1.2 ml ずつ集め, それぞれの吸光度を280 nm で測定した. 各 tube 中の RI カウント(dpm) はアクアゾール2の8 ml の入ったバイアル中に溶出液1 ml および水1 ml を加え, 振盪, ゲル化し約30分間室温に置いたのち, 液体シンチレーションカウンター(Mark III)で測定, β-鎖およびα-鎖グロビンの比活性値および全活性値からそれぞれのβ/α比を求めた.

結 果

reticulocyte 数の測定はニューメチレンブルー染色法⁸⁾によって行ない, reticulocyte 濃縮前・後の数値からその濃縮度を求めた.

Table 1 に示すように正常人血液中の reti-

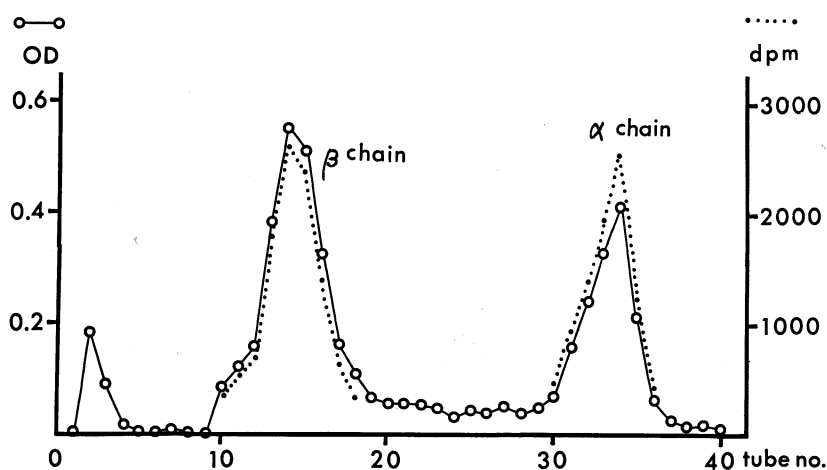


Fig. 2 Analysis of the biosynthesized hemoglobin in vitro from normal peripheral blood with CM cellulose (CM 23) microcolumn chromatography. This analyzed blood sample contained 2.8 percent of Hb A₂ and 0.2 percent of Hb F as minor hemoglobin components. The data resulting from this analytic method were as follows:

	radioactivities (dpm)		β/α ratio
	β or non-α chain	α chain	
specific activities	7077	5922	1.20
total activities	6830	5906	1.16

Table 1 The percentages and ratio(Rc/Ro) of reticulocytes contained in the original red cells (Ro) from the normal peripheral bloods and after centrifugation at 15,600 xG at 4°C for 30 min (Rc).

case	reticulocytes (%)		Rc/Ro
	Ro	Rc	
I	0.7	6.8	9.7
II	0.2	2.0	10.0
III	0.7	7.4	10.6
IV	0.5—0.6	4.5—5.0	7.5—10.0

culocyte 数は1%以下であり、通常の血液でのヘモグロビン合成には不向きであることがうかがえる。この濃縮された reticulocyte rich red cell での合成ヘモグロビンのカラムクロマト法によるグロビン分析は Fig. 2 に示すように β -鎖(non- α -鎖グロビン) および α -鎖グロビンへの ^{14}C -ロイシンの取り込みも十分であり、それぞれグロビンに対する比活性値、全活性値とも高い値を示した。低濃度 reticulocyte を含む血液でのヘモグロビン合成・微量分析が可能であることを示した。

考 察

正常人あるいは正常人と同程度の reticulocyte を含む血液での幼若赤血球の生化学的研究は非常に困難なものである。しかし、このように遠心することのみで reticulocyte rich red cell を高濃度に回収することが可能であれば血液に関する研究の進展も望まれる。幼若赤血球(比重の軽い赤血球)あるいは老化赤血球(比重の重い赤血球)内では血液成分(例えば HbF, HbA_{1c} の成分量)量, 血球内酵素類, 各種イオンの含量にも変動がみられ, また血球膜組成の変動も予想される。この研究実験には原料血液を約 5 ml (血球にして約 2 ml) を使用し, 一度の高速遠心で reticulocyte を約 10 倍に濃縮したが, さらに高濃度 reticulocyte rich red cell を必要とする場合には 2~3 度とくり返えし同操作を行えばさらに高濃度 reticulocyte rich red cell の回収が可能である。これにより種々の赤血球全般に渡っての研究が進展するものと考えられる。

本研究は川崎医科大学, 昭和53年度プロジェクト研究費(53-104)によって行なった。

文 献

- 1) Danon, D. and Marikovsky, Y. J.: Determination of density distribution of red cell population. *J. Lab. Clin. Med.* 64: 668—674, 1964
- 2) Boyd, E. M., Thomas, D. R., Horton, B. F. and Huisman, T. H. J.: The quantities of various minor hemoglobin components in old and young human red blood cells. *Clin. Chim. Acta* 16: 333—341, 1967
- 3) Leif, R. C., and Vinograd, J.: The distribution of buoyant density of human erythrocytes in bovine albumin solutions. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 51: 520—528, 1964
- 4) Gradina, D. J., Milas, L., Hewitt, R. R. and Withers, H. R.: Buoyant density separation of human blood cells in Renografin gradients. *Exp. Cell Res.* 81: 250—254, 1973
- 5) DeSimone, J., Kleve, L. and Shaeffer, J.: Isolation of a reticulocyte-rich fraction from normal human blood on Renografin gradients. *J. Lab. Clin. Med.* 84: 517—524, 1974
- 6) Fitzgibbons, J. F., Koler, R. D. and Jones, R. T.: Red cell age-related changes of hemoglobins A_{1a+b} and A_{1c} in normal and diabetic subjects. *J. Clin. Invest.* 58: 820—824, 1976
- 7) 原野昭雄, 小出智子, 上田 智, 柴田 進: ヘモグロビン合成に関する研究. II, ヘモグロビンの CM セルロースカラムクロマトグラフィー分析: ミクロカラムクロマトグラフィー分析法の開発. *川崎医学会誌.* 5: 97—101, 1979

- 8) Brecher, G.: New methylene blue as a reticulocyte stain. *Am. J. Clin. Pathol.* 19: 895—896, 1949
- 9) Lingrel, J. B. and Borsook, H.: A comparison of amino acid incorporation into the hemoglobin and ribosomes of marrow erythroid cells and circulating reticulocytes of severely anemic rabbit. *Biochemistry* 2: 309—314, 1963
- 10) Long, K. W. and Karson, P. E.: Increased erythrocyte glutathione reductase activity in diabetes mellitus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 5: 394—399, 1961
- 11) DeSimone, J., Magid, E., Liude, M. and Tashian, R. E.: Genetic variation in the carbonic anhydrase isoenzymes of macaque monkeys. III. Biosynthesis of carbonic anhydrases in bone marrow erythroid cells and peripheral blood reticulocytes of *Macaca nemestrina*. *Arch. Biochem. Biophys.* 158: 365—376, 1973
- 12) Paglia, D. E. and Valentine, W. N.: Evidence for molecular alteration of Pyruvate kinase as a consequence of erythrocyte aging. *J. Lab. Clin. Med.* 76: 202—212, 1970