

血漿 pH および赤血球内 pH に対するヘモグロビンの Bohr 効果係数について

金沢大学大学院医学研究科生理学第一講座(主任 齋藤幸一郎教授)

宮 下 敏

(昭和44年2月8日受付)

ヘモグロビン (Hb) の機能を特徴づける現象の1つとして、いわゆる Bohr 効果¹⁾がある。これは Hb の酸素親和性が pH の低下に伴って小さくなるという現象で、その大きさは sO_2 (Hb の酸素飽和度) 50% を与える pO_2 の対数 ($\log P_{50}$) と pH との間の次式、 $-d \log P_{50}/d \text{pH}$ で表わされる。最初、Bohr らは血液の pCO_2 を高めると酸素解離曲線が右方へ偏位することを発見し、その後この偏位は pH の低下によるものと説明された。血液の Bohr 効果は血漿 pH の増加に対する、 $\log P_{50}$ の低下度で表わされ、ヒト血液では Dill の求めた 0.48²⁾ がもっとも汎く用いられている。また、各種哺乳類やその胎児の血液についての Bohr 効果を測定した研究には、Keys ら³⁾、Dill ら⁴⁾、Darling ら⁵⁾、Riggs⁶⁾、Kirschbaum⁷⁾ 等の報告があり、血漿 pH の代りに赤血球内 pH を用いての Bohr 効果を算出した報告として、Hilpert ら⁸⁾、Bartels ら⁹⁾、Baumann ら¹⁰⁾ 等の研究がある。

ウシ血液の Bohr 効果について、Hilpert ら⁸⁾ は Henderson-Hasselbalch の式を用いて計算した血漿 pH に対する Bohr 効果の値 0.49 を報告、Riggs⁶⁾ は稀薄な Hb 溶液を用いて 0.52 を報告しているが、実測血漿 pH および赤血球内 pH に対する Bohr 効果についての報告は見当たらない。

著者は、ウシ血液 pH および赤血球内 pH に対する Bohr 効果を、 sO_2 25, 50, 75% の3集団に分けて比較測定し、これより pH の変化が血液の酸素解離曲線の S 字状彎曲度 (Hill 式¹¹⁾ の n) に影響するかどうかを検討した。

実験材料および実験方法

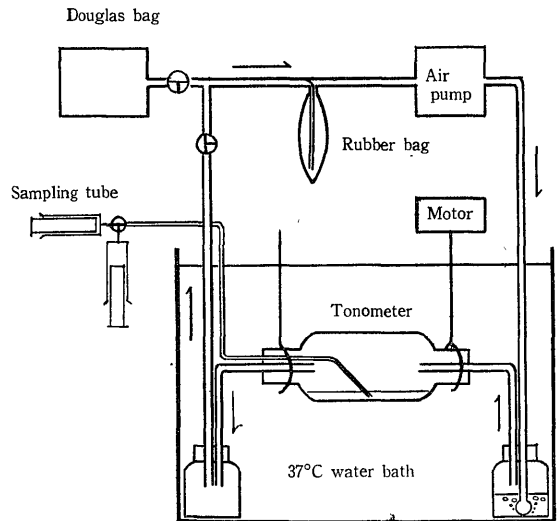
Bohr 効果は特定の sO_2 における pH の変化 ($d \text{pH}$) に対する pO_2 の対数変化 ($d \log pO_2$)、すなわち $-d \log pO_2/d \text{pH}$ として表わされる。

著者は次の方法で、A (pCO_2 低く、 $pO_2 \neq 0$)、B (pCO_2 高く、 $pO_2 \neq 0$)、C (空気で平衡させ酸素飽和度 100%にしたもの) の3種の血液試料を作り、A と C および B と C を適当に気密下に混合し、 pCO_2 したがって pH は異なるが共通の sO_2 を有する2本の試料 D と E を作り、それぞれの pH、 $\log pO_2$ の差より Bohr 効果を求めた。

I. Hb の血漿 pH (pH_p) に対する Bohr 効果の求め方

ウシ血液 (加ヘパリン 3300 unit/l) を、図1に示した血液ガス平衡回路装置¹²⁾ のトノメーター中に約 20 ml 入れ、窒素ガスで 37°C 50分間充分平衡させて、血液中の酸素をできるだけ除去したのち、活栓で外気と断った回路に pCO_2 が 20~30mmHg になるよう

図1 血液ガス平衡装置



→ はガスの流れる方向を示す。

Measurement of the Bohr Effect in Relation to the pH of Plasma and of Erythrocytes. Satoshi Miyashita, Department of Physiology (I) (Director: Prof. K. Saito), School of Medicine, Kanazawa University.

CO₂ を注入し、さらに10分間平衡させた。平衡後、予め水銀で死腔を満たした試料採取用注射器に、血液試料Aを気密下に約8ml採取する。次に、この密閉回路中の pCO₂ を 120~140mmHg にすべき CO₂ を追加注入して、トノメーター中の残りの血液を再度10分間平衡させたのち、気密下に試料Bを約8ml、別の試料採取用注射器に採った。試料AおよびBを採取後、活栓を開放して回路内ガスを空気で満たし、トノメーター中に新たに約20mlの血液を注入し、空気で37°C 50分間平衡させた。完全に酸素と飽和した試料Cを2本の試料採取用注射器にそれぞれ約8mlづつ採取した。採取試料A、B、Cの一部は直ちに、Van Slyke & Neil の測圧式血液ガス分析器にて、血液酸素および炭酸ガス含有量を測定するのに供した。残りは注射器に気密状態のまま、0°C 冷蔵庫に一時保存した。血液に対する酸素の Bunsen の吸収率を 0.0237¹³⁾ として、試料Cより酸素容量を求め、sO₂=100% とし、試料A および B の sO₂=a% および b% (いずれも微量) を求めた。A と C、B と C を混合して共通の sO₂ を有する2本の試料DおよびEを作るのに、

$$S=ax+100(1-x)=by+100(1-y)$$

の方程式に、共通 sO₂=S%, 上記測定のアおよびbの値を代入して、x (AとCの混合におけるAの占める比率) および y (BとCの混合におけるBの占める比率) を求めた。これよりA:C、B:Cの混合比を算出して、微量注入装置(マイクロメーターに注射器を備えつけた装置)を用いて、保存中の試料AとC、BとCをそれぞれ気密下に混合し攪拌して、特定のsO₂=S%で、しかもpHを異にする2本の試料DとEを作成した。この試料の酸素含有量は、Van Slyke & Neil の血液ガス分析器にて測定、正確なsO₂を求めた。また、試料のpO₂および血漿pHは、それぞれ酸素電極およびガラス電極(Beckman physiological gas analyzer model 160)で37°Cにて3回づつ測定し、その平均値をとった。試料DおよびEの血漿pHをd₁, e₁で、pO₂をd₂, e₂で表わすと、Bohr効果は $-d \log pO_2/d pH_b = -(\log d_2 - \log e_2)/d_1 - e_1$ で表わすことができる。

II. Hbの赤血球内pH(pH_c)に対するBohr効果の求め方

血液を8000 r.p.m. 10分間遠心して血漿を分離除去し、分離赤血球を最小必要量の saponin 粉末で溶血させ、消泡剤として octyl alcohol を数滴添加した試料にて、Iと同方法で実験を行なった。ただし、試料AのpCO₂を0mmHgに、試料BのpCO₂を80~120mmHgに調製した点はIと異なる。また、ウシ

赤血球に対する酸素の Bunsen の吸収率は0.0261¹³⁾を用いた。

実験結果

I. Hbの血漿pHに対するBohr効果係数の測定
全血(Hb濃度約14g/dl)のsO₂を25, 50, 75%の3集団に分けてBohr効果を求めた。表1はその集団別に、2本の試料のsO₂(%), pH_b, log pO₂ および2本の試料のpH_b, log pO₂の差、すなわち $-d \log pO_2/d pH_b$ を示す。

sO₂が約25% (23.7±2.1%)の集団のBohr効果

表1 血漿pH(pH_b)に対するBohr効果係数

No.	sO ₂ (%)	pH _b	log pO ₂ (mmHg)	-d log pO ₂ / d pH _b
1	21.2	6.82	1.633	.484
	21.3	7.59	1.260	
2	22.1	6.79	1.657	.555
	22.5	7.74	1.130	
3	25.1	6.80	1.641	.550
	25.0	7.75	1.125	
4	26.0	6.85	1.602	.503
	26.1	7.84	1.104	
5	48.0	7.25	1.661	.517
	48.1	7.48	1.542	
6	48.5	7.29	1.556	.558
	48.2	7.41	1.489	
7	50.0	7.38	1.568	.538
	50.6	7.59	1.455	
8	52.1	7.28	1.623	.556
	52.5	7.64	1.423	
9	54.3	7.27	1.615	.575
	53.1	7.71	1.362	
10	55.8	7.48	1.556	.532
	54.7	7.70	1.439	
11	73.1	6.87	1.943	.546
	73.6	7.50	1.599	
12	73.3	6.91	1.928	.497
	74.3	7.61	1.580	
13	74.7	6.81	2.015	.563
	74.1	7.65	1.542	
14	76.0	6.85	1.970	.540
	75.5	7.80	1.463	
15	75.9	7.40	1.681	.582
	76.0	8.00	1.332	
$\bar{x} \pm S. D.$.540 ± .029

係数 r は、 $r=0.523\pm 0.035$ 、 sO_2 が約 50% (51.4 \pm 2.9%) の集団では、 $r=0.546\pm 0.021$ 、 sO_2 が約 75% (74.7 \pm 1.2%) では、 $r=0.546\pm 0.033$ をそれぞれ算出した。

この 3 集団の平均値および標準誤差より、それぞれの平均値間に有意の差を認めることはできなかった。それ故に、3 集団の全実験例 (15例) より、 $r=0.540\pm 0.029$ を算出することができる。

II. Hb の赤血球内 pH に対する Bohr 効果係数の測定

溶血赤血球 (Hb 濃度約 28 g/dl) の sO_2 を I と同様に、25, 50, 75% の 3 集団に区分して、Bohr 効果を求めた。表 2 は表 1 に準じて記載した。ただし、 pH_c は赤血球内 pH を示す。

sO_2 が約 25% (27.5 \pm 1.3%) では、 $r=0.783\pm 0.043$ 、 sO_2 が約 50% (53.1 \pm 1.6%) では、 $r=0.791\pm 0.029$ 、 sO_2 が約 75% (76.1 \pm 0.7%) では、 $r=0.805\pm 0.028$ を算出した。この 3 集団のそれぞれの平均値間にも統計学的な有意の差は認められなかった。それ故、3 集団の全実験例 (17例) より、 $r=0.793\pm 0.032$ を算出した。

図 2 は、 $-d \log pO_2/d pH_b$ および $-d \log pO_2/d pH_c$ と sO_2 (%) の関係を示す。

考 察

一般に血液の Bohr 効果は血漿 pH の増加に対する $\log P_{50}$ の低下度、 $-d \log P_{50}/d pH$ で表わされる。

血漿 pH の代りに赤血球内 pH を用いて Bohr 効果を算出すると、その値はやや大きくなるという報告がなされている⁸⁾⁻¹⁰⁾。著者の成績においても明らかに赤血球内 pH に対する Bohr 効果の値が大である。これは血漿 pH に比べて赤血球内 pH の変動が小さいためであるうとされている¹⁴⁾。血漿 pH と赤血球内 pH の関係について、Baumann ら¹⁰⁾ はヤギとウマについて全血 pH、すなわち血漿 pH (pH_b) と赤血球内 pH (pH_c) の間の関係を、 $pH_c=b(pH_b+a)$ の形で表わしている。Hilpert ら⁸⁾ は種々の哺乳類につき、また石川¹⁵⁾ はウシについて同様の関係式を記載しているが、そのいずれも係数 b の値が 0.59~0.90 の範囲にあり、1 より小さい値を示す。この関係式より血漿 pH が 1 だけ変動しても、赤血球内 pH はそれより小さい変動にとどまることが理解できる。

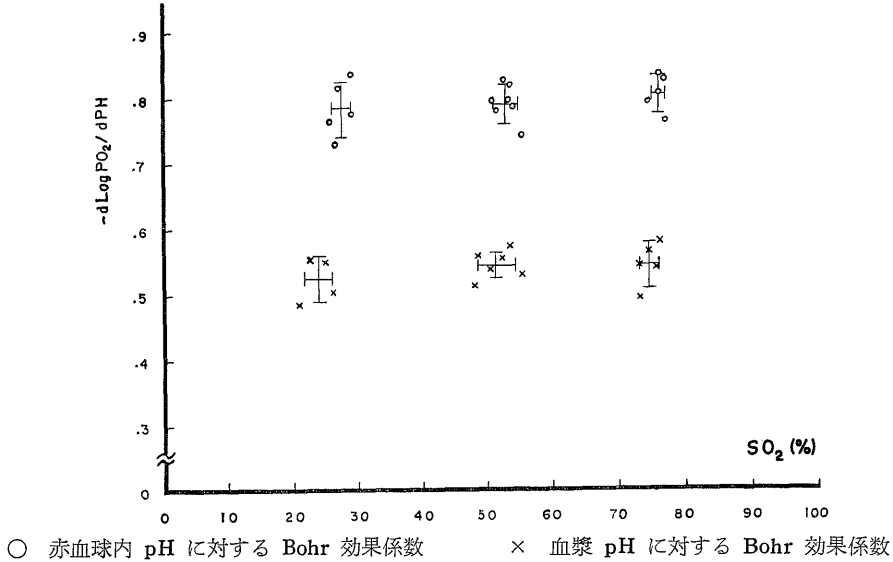
Kirschbaum⁷⁾ はヒト胎児血液を用いた実験において、 sO_2 の程度により Bohr 効果の値が異なることを報告している。

表 2 赤血球内 pH (pH_c) に対する Bohr 効果係数

No.	sO_2 (%)	pH_c	$\log pO_2$ (mmHg)	$-d \log pO_2/d pH_c$
1	25.2 25.5	6.98 7.72	1.462 0.898	.762
2	26.6 26.9	7.06 7.79	1.519 0.987	.729
3	27.2 27.3	7.08 7.72	1.574 1.053	.814
4	28.8 29.0	7.12 7.81	1.597 1.021	.835
5	29.0 29.3	7.06 7.74	1.604 1.076	.776
6	51.3 50.8	7.20 7.48	1.534 1.312	.793
7	50.7 51.7	7.24 7.62	1.519 1.223	.779
8	52.8 52.5	7.11 7.43	1.626 1.362	.825
9	53.7 53.2	7.19 7.74	1.578 1.127	.820
10	53.7 53.6	7.23 7.68	1.613 1.255	.796
11	54.7 53.8	7.23 7.71	1.600 1.223	.785
12	55.3 55.9	7.20 7.73	1.629 1.238	.738
13	74.7 75.6	7.28 7.47	1.574 1.423	.795
14	76.4 75.5	7.46 7.69	1.572 1.380	.835
15	76.2 76.2	7.36 7.67	1.627 1.378	.803
16	76.8 76.6	7.28 7.50	1.617 1.435	.827
17	76.2 77.2	7.25 7.52	1.653 1.447	.763
$\bar{x} \pm S. D.$.793 \pm .032

著者は sO_2 の程度と Bohr 効果の関係を、全血および溶血赤血球を用いて、 sO_2 50% を中心に 25, 75% の 3 集団に分けて検索したが、いずれにおいても、 sO_2 の程度と Bohr 効果の値の間に、統計学的な有意の差を認めなかった。したがって、少なくとも sO_2 が 25~75% の範囲において、血漿 pH および赤血球内 pH に対する Bohr 効果係数は、それぞれ 0.540 および 0.793 であるといえる。

図2 Hb の酸素飽和度と Bohr 効果係数の関係



以上の所見より、pH の変化に伴ない P₅₀ (酸素親和性) が変動することは理解できよう。

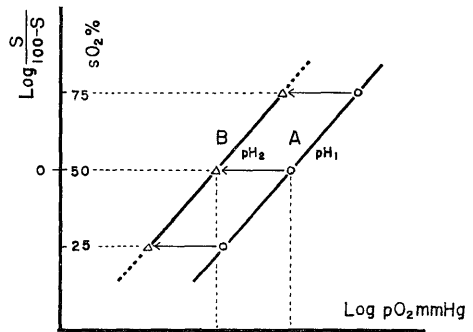
それでは一方、n は pH の変化に対して如何なる変化を生ずるであろうか。これに関して著者は図3の模式図を用いて考察した。

$\log \frac{sO_2}{100-sO_2}$ を縦軸に、 $\log pO_2$ を横軸にとり、pH (血漿 pH あるいは赤血球内 pH のいずれか一方に限定して考える) が pH₁ の時の酸素解離曲線を直線Aで表わした。ここで sO₂ 50%、すなわち、 $\log \frac{sO_2}{100-sO_2} = 0$ を与える $\log pO_2$ は $\log P_{50}$ (酸素親和性) を表わし、直線の傾斜は n (ヘムヘム相互作用) の大きさを表わす。次に pH を pH₁ から pH₂ に変えた時 (ただし pH₁ < pH₂ とす)、その酸素解離曲線は直線Bで表わされる。この際、sO₂ が25~75%の範囲において Bohr 効果の差はなかったから、少なくともこの範囲においては、直線Bは直線Aを左方に平行移動したにとどまり、直線の傾斜 n は全く変化していないといえる。すなわち、pH の変化は P₅₀ (酸素親和性) に変化をもたらすが、n の値 (ヘムヘム相互作用; S 字状彎曲度) に変化をもたらしていないと推論しうる。

総括および結論

ウシ血液の血漿 pH および赤血球内 pH に対する Bohr 効果を測定し、これより pH の変化が血液の酸素解離曲線の S 字状彎曲度 (Hill 式の n) に影響するかどうかを検討した。

図3 Bohr 効果に伴なう酸素解離曲線の位置および形の変動



- A: pH₁ の時の酸素解離曲線
- B: pH₁ → pH₂ の時の酸素解離曲線 (pH₁ < pH₂ とす)
- A, B の直線の傾斜 (勾配) は n を表わし、sO₂ 50% における pO₂ は P₅₀ を表わす。

1. 血漿 pH に対する Bohr 効果係数 r は sO₂ が 25~75% の範囲において

$$r = 0.540 \pm 0.029$$

の値を算出した。

2. 赤血球内 pH に対する Bohr 効果係数 r は sO₂ が 1 と同範囲において

$$r = 0.793 \pm 0.032$$

の値を算出した。

3. pH の変化に伴ない酸素解離曲線の P₅₀ は変化するが、n は変化しないことを考察した。

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斎藤幸一郎教授に深く謝意を表します。さらに有益なる御助言と御協力を戴いた本田助教ならびに高野講師に感謝致します。

文 献

- 1) Bohr, C., Hasselbalch, K. & Krogh, A. : Skand. Arch. Physiol., 16, 402 (1904).
- 2) Dill, D. B., Graybiel, A. & Taquini, A. C. : Zschr. Altersforsch., 2, 20 (1940).
- 3) Keys, A., Hill, F. C., Barron, D. H. & Guzman, E. S. : Amer. J. Physiol., 115, 392 (1936).
- 4) Dill, D. B. & Forbes, W. H. : Amer. J. Physiol., 132, 685 (1941).
- 5) Darling, R. C., Smith, C. A., Asmussen, E. & Cohen, F. M. : J. Clin. Invest., 20, 739 (1941).
- 6) Riggs, A. : J. Gen. Physiol., 43, 737 (1960).
- 7) Kirschbaum, T. H. : J. Appl. Physiol., 18, 729 (1963).
- 8) Hilpert, P., Fleischman, R. G., Kempe, D. & Bartels, H. : Amer. J. Physiol., 205, 337 (1963).
- 9) Bartels, H., Hilpert, P., Barbey, K., Betke, K., Riegel, K., Lang, E. M. & Metcalfe, J. : Amer. J. Physiol., 205, 331 (1963).
- 10) Baumann, P., Hilpert, P. & Bartels, H. : Pflügers Arch. Physiol., 277, 120 (1959).
- 11) Hill, A. V. : J. Physiol., 40, 4 (1910).
- 12) 西田玲子 : 日生理誌, 30, 727 (1968).
- 13) 斎藤幸一郎 : 血液化学 (黒田嘉一郎ら編) 56頁, 東京, 朝倉書店, 1963.
- 14) 斎藤幸一郎 : 医学のあゆみ, 58, 143 (1966).
- 15) 石川克己 : 十全医会誌, 77, 203 (1968).

A b s t r a c t

By the use of bovine whole blood or hemolyzed red cells, the Bohr effect being related to plasma and erythrocyte pH was determined at three levels in oxygen saturation, 25, 50 and 75% respectively.

The results obtained were as follows ;

1) Bohr effect at a given level in oxygen saturation is expressed as $-d \log pO_2 / d pH_b$, where pH_b signifies plasma pH.

The magnitudes of Bohr effect at three oxygen saturation levels were calculated as 0.523 ± 0.035 (mean \pm standard deviation), 0.546 ± 0.021 and 0.546 ± 0.033 , respectively. No significant differences were seen among these three means. Therefore, the average magnitude in Bohr effect was calculated as 0.540 ± 0.029 from all of the three groups.

2) Bohr effect being related to erythrocyte pH is expressed as $-d \log pO_2 / d pH_c$, where pH_c represents erythrocyte pH.

The magnitudes of Bohr effect at three oxygen saturation levels were calculated as 0.783 ± 0.043 , 0.791 ± 0.029 and 0.805 ± 0.028 , respectively. Since these three means were not statistically different, the average magnitude in Bohr effect was obtained as 0.793 ± 0.032 .

3) When pH was altered in studying oxyhemoglobin dissociation curve, a remarkable change was observed in oxygen affinity, but none in heme-heme interaction.