

血液成分の酸塩基平衡に関する研究

〔Ⅱ〕 赤血球内容の滴定曲線とこれに及ぼす CO_2 の影響

金沢大学大学院医学研究科小児科学講座(主任 佐川 一郎教授)

金沢大学大学院医学研究科生理学第一講座(研究主任 斎藤幸一郎教授)

石 川 克 巳

(昭和43年7月5日受付)

本論文の要旨は1967年9月に第13回生理学中部談話会において発表した。

血液の緩衝能は体液の酸塩基平衡の維持に重要な働きを演じているが、血液の緩衝能の重要な部分は赤血球のそれで占められる。ことに CO_2 の変動に原因するいわゆる呼吸性酸塩基平衡異常に対しては重炭酸緩衝系の緩衝能はさほどの効果を發揮し得ないから、この際の血色素緩衝系の重要性は相対的には一層増大する。

生理的状态にある赤血球を構成する緩衝物質として血色素の外に重炭酸系、諸種の有機性磷酸エステル、細胞基質としての蛋白質等が考えられるが主要なものは前2者である。

血色素や赤血球または全血についてその緩衝能を測定した研究は表5にまとめたように、少なくない。古くは Van Slyke ら¹⁾ がウマの結晶血色素の水溶液を強酸または強アルカリで滴定し、その滴定曲線より O_2Hb および Hb の分子緩衝価を求め、それぞれ 2.64, 2.45 mEq/l. pH と報告している。

その後血色素、赤血球等について同様の実験が行なわれているが、その試料の前処置ことに重炭酸含有の有無、滴定に用いる酸の種類、重炭酸系をふくむ場合には、滴定時の CO_2 脱出に対する配慮の有無等、実験条件が異なるためその成績も当然一致しないがそれぞれ意義が認められる。

最近では多くの成書において O_2Hb および Hb の分子緩衝価を約 3.0 mEq/l. pH としている。(Davenport²⁾, Pitts³⁾, Woodbury⁴⁾, Neil^ら⁵⁾), そして血色素は重炭酸系と全く独立に緩衝能を發揮するものとして取り扱われてきた。

しかるに近年 Roughton ら⁶⁾ は興味ある実験所見

を短報で報告している。それによると、 CO_2 の共存しない条件の下では O_2Hb と Hb の滴定曲線は、先人の所見の通り、生理的 pH 領域では、平行する直線とみなし得る。両曲線の間のひらきは O_2Hb が Hb より、より強い酸であることを示している。

しかし血液のように CO_2 が共存する場合には事情が異なることを指摘した。すなわち O_2Hb と Hb は共に CO_2 の存在下では、その分子間の特定の NH_2 基が CO_2 と結合して carbamino 酸基となり、これが酸として解離するため pH の増加するに従って、滴定曲線は急上昇する。かつ、 Pco_2 50 mmHg の下では pH の増加と共に両曲線は接近し、pH 7.45 で交叉し、これより pH の高い領域では Hb が O_2Hb より強い酸となるため Hb の滴定曲線は O_2Hb の滴定曲線より高い位置をとるといふ。

その後の実験所見に関しては Roughton⁷⁾⁸⁾ が綜説を発表し、最近 Roughton ら⁹⁾ は理論的検討を試みている。

これらの Roughton の所見は従来行なわれている『血液中の O_2Hb の deoxygenation による弱酸化が CO_2 の収容による血液の pH 低下を緩衝する』という定説の再検討を要請するものと考えられる。

著者はなるべく自然の状態に近い Hb 溶液として溶血した赤血球を試料として Roughton らの実験を追試した。すなわち試料の Hb の酸素化および還元したものについて、その Pco_2 を 0, 38, 50 mmHg に調製しつつ、強アルカリを以て滴定し、滴定曲線を作製した。その結果、Roughton らの所見を追証する成績を得たので、 Hb を methemoglobin 化したり

Studies on the Acid-base Equilibrium of the Blood Components, (II) The Influence of CO_2 on the Titration Curve of Hemolyzed Red Cells, **Katsumi Ishikawa**, Department of Pediatrics (Director: Prof. I. Sagawa), Department of Physiology (I) (Director: Prof. K. Saito), School of Medicine, Kanazawa University.

CO と結合させた場合の所見とあわせてここに報告する。

実験方法

I. 赤血球の脱 CO₂ の操作

ヘパリンを 3000 unit/l の濃度で加えたウシ血液を 15°~20°C の室温において、3000r.p.m. (半径 14cm) で30分間遠心し、赤血球を血漿から分離した。その血球に M/5 醋酸と M/5 醋酸ソーダを 1.9 対 18.1 の比に混合した pH 5.7 の醋酸緩衝液と生食水を等量に加えた混合液を等量加え、静かに混合した。この混合液を 3~5 分間遠心し、醋酸緩衝液と生食水の混合液を取り除いた。この操作を 2~3 回繰り返した。その後その赤血球をさらに、生食水で同様に 3 回ほど遠心分離をくりかえしてこれを洗滌し、CO₂ free の赤血球を得た。

このように醋酸緩衝液と生食水で処理した赤血球は CO₂ を殆んど含まないことを、Van Slyke and Neil の測圧式血液ガス分析器により確かめた。

また、最後に赤血球を高速冷凍遠心機にかけ、10,000r.p.m. 3~5 分間、遠心分離を行ない、余分の水分を取り除いた。

すべての実験は採血後冷蔵庫保存 5 日以内の血液について行なわれた。

II. 滴定曲線の作製

1. CO₂ の共存しない場合

1) O₂Hb を含む赤血球内容の滴定曲線

その赤血球内容をあらかじめ充分酸素化し、これを 5~6 本の試験管に一定量 (3~5 cc) ずつ取り、これらに約 2N の NaOH を色々の量だけ加え、10% saponin 溶液を少量加えて溶血させ、水を加えて Hb 濃度を一定に調製した。これら 5~6 本の試料について 37°C における pH を測定し、これと加えた NaOH 量の関係、すなわち滴定曲線を求めた。

2) Hb を含む赤血球内容の滴定曲線

図 1 に示すような 37°C の恒温槽内で 5~6 本の約 20 cc 容量のトノメーターに CO₂ free の試料をそれぞれ 2 cc 程注入し、約 1 時間、振盪しながら、N₂ ガスを流して、試料の Hb を完全に deoxygenate させた。平衡後その試料をトノメーターから 5 cc 注射器に気密下に取り出し、saponin 10% 水溶液を少量加えて溶血させて、直ちに 37°C で pH 測定を行なった。上述の O₂Hb と同様に pH と加えた NaOH 量の関係、すなわち滴定曲線を求めた。

2. Pco₂=38 と 50 mmHg の場合

Pco₂=38 と 50 mmHg 前後のときの赤血球内容につ

いて、次のようにして、O₂Hb と Hb の滴定曲線を求めた。

2 個のビニールバックに O₂Hb 用に空気、Hb 用に N₂ ガスをガスメーターを通して 100~150 l 正確に測定して取り、これに CO₂ を加えて Scholander ガス分析器で検定しつつ Pco₂=38 と 50 mmHg 前後に調製した。赤血球内容を、Pco₂=38 と 50 mmHg のときに生理的 pH 領域になるように約 2N の NaOH を色々の量だけ加え、10% saponin 水溶液を少量加えて溶血させ、水を加えて Hb 濃度を一定として、調製した。

Pco₂=38 と 50 mmHg に調製した空気または N₂ ガスを 37°C のトノメーター内で、30分~1 時間流して、試料を完全に oxygenate または deoxygenate した。平衡後その試料をトノメーターから注射器に気密下に取り出し、saponin 10% 水溶液を少量加え溶血させて、直ちに 37°C で pH 測定を行なった。CO₂ の共存しないときの実験と同様に、pH と加えた NaOH 量の関係、すなわち滴定曲線を求めた。

3. Hb を CO-Hb とした赤血球内容の滴定曲線

都市ガスを NaOH 溶液に通して CO₂ を除去し、これを既知量の NaOH を加えて pH を異にした 5 本の試料に、1~3 分間通じて、その Hb を完全に carboxyhemoglobin とした。37°C における pH を測定し、CO₂ の共存しない場合の CO-Hb 含有試料の滴定曲線を求めた。

次にこの CO-Hb 含有試料を 37°C の恒温槽中のトノメーター内で、Pco₂=50 mmHg の CO₂ と Pco 1 mmHg の CO を含む N₂ ガスと 30分~1 時間平衡させた。その試料を 37°C で pH を測定、Pco₂=50 mmHg の CO-Hb 含有赤血球内容の滴定曲線を求めた。

4. Hb を methemoglobin 化した赤血球内容の滴定曲線

Hb の 2 価鉄が当量の K₃Fe(CN)₆ と反応することに基づき、試料の Hb を完全にメト化するのに必要な K₃Fe(CN)₆ と saponin 粉末を赤血球に加えて、完全にメト化した。

なおこの赤血球内容はその Hb をメト化すると粘稠性を増し、実験操作に困難をきたすので、止むを得ず、試料をいくらか稀釈して実験に供した。

また、試料の Hb が完全にメト化していることは、Hitachi の Photoelectric spectrophotometer (630 mμ) で Evelyn-Malloy の方法¹⁰⁾¹¹⁾により確かめた。

こうして Hb を methemoglobin にした試料を約

図 1-1

図 1-1 は上から見た図, 図 1-2 は横から見た図を示す。

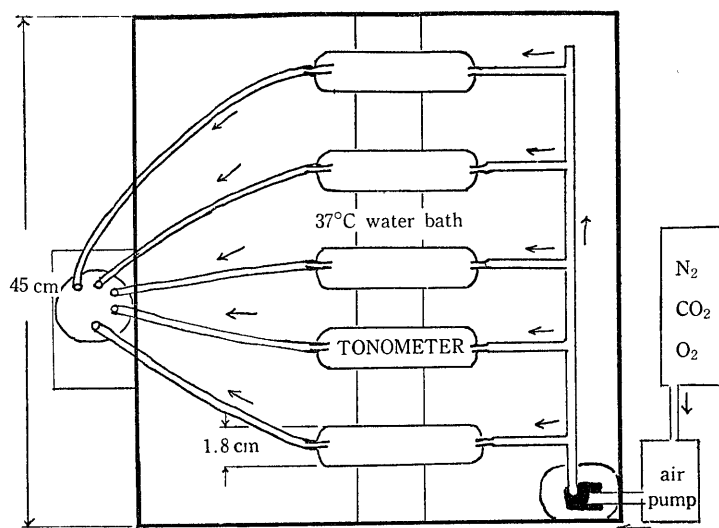
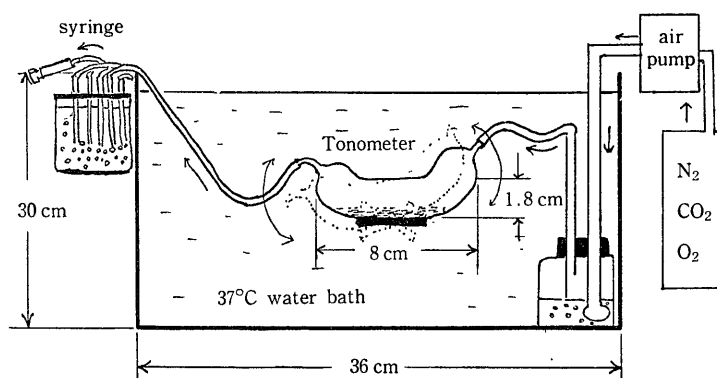


図 1-2



→の方向は、ガスが流される方向を示す。トノメーターはシーソーのように上下に振動する。

2N の NaOH で滴定しつつ pH を測定し, CO_2 の共存しない場合の滴定曲線を求めた。

また, 酸素化した赤血球内容を用いた場合と同様に, 試料を $\text{Pco}_2=50\text{ mmHg}$ に調製した空気と 37°C のトノメーター内で 30分～1時間平衡させ, 37°C で pH を測定, $\text{Pco}_2=50\text{ mmHg}$ の滴定曲線を求めた。

Ⅲ. 測 定

1. pH 測定

当教室作製の管型ガラス電極¹²⁾と pH meter model P (Horiba Instruments Inc.) を組合わせて, 37°C の油恒温槽中で測定した。

pH 測定 calibration 用には, 37°C で pH 7.385 のリン酸緩衝液と pH 6.84 の Beckman 標準液を使用した。

2. Hb 濃度測定

Cyanmethemoglobin 法により, Hitachi の光電比色計 (530 mμ) を使用した。

3. 赤血球内容の水分含有量測定

乾燥法により, 乾燥前後の重量差 (g) を容積 (cc) で割った値 (g/cc) として求めた。

以下測定値を統計学的に処理して得られた平均値を \bar{x} , これに附随する標準誤差を SE, 測定値に附随する標準偏差を SD, n を試料数とする。

実 験 成 績

I. O_2Hb および Hb を含む赤血球内容の滴定曲線

1. CO_2 の共存しない場合

O_2Hb および Hb を含む赤血球内容の滴定曲線の

3例の実験成績を図2, 3, 4に示した。これらの図にみられるように CO_2 の共存しない場合における O_2Hb および Hb を含む赤血球内容の滴定曲線 I, II は生理的 pH 領域では、直線とみなし得るから、その pH 軸に対する傾斜より分子緩衝価（ヘモグロビン 1 M 当りの緩衝価を意味する）を求めた。表1は23~24例について得られた実験成績であって、ここに示されるように、 O_2Hb を含む赤血球内容の分子緩衝価の平均値は、 2.39mM/L. pH ($n=24$, $\text{SE}=0.049$, $\text{SD}=0.242$) となり、赤血球の単位水分含有量当りの値は $3.20\text{mM/L. H}_2\text{O. pH}$ となった。

また、 Hb を含む赤血球内容の分子緩衝価は 2.42mM/L. pH ($n=23$, $\text{SE}=0.045$, $\text{SD}=0.216$) で、赤血球の単位水分含有量当りの値は $3.22\text{mM/L. H}_2\text{O. pH}$ となった。

2. $\text{Pco}_2=38$ と 50 mmHg の場合

図2, 3, 4に示すような $\text{Pco}_2=38$ と 50 mmHg のように Pco_2 の高い場合には、 O_2Hb および Hb の滴定曲線 I'', II'' は pH の増大と共に接近し、大

図2 O_2Hb (●) 及び Hb (○) を含む赤血球内容の滴定曲線:

I, II は CO_2 の共存しないときの滴定曲線, I', II' は I と II に $\text{Pco}_2=38\text{ mmHg}$ のときの HCO_3^- の濃度を I, II にそれぞれ上積みしたときの滴定曲線, I'', II'' は $\text{Pco}_2=38\text{ mmHg}$ の観測された滴定曲線を示す。

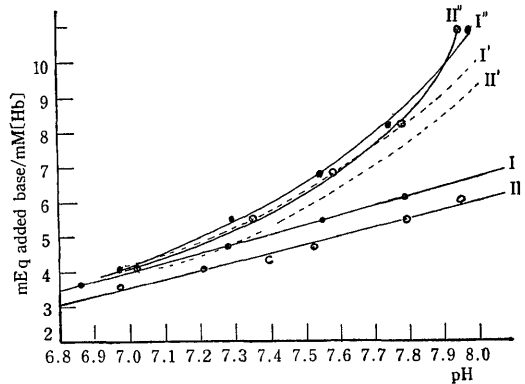
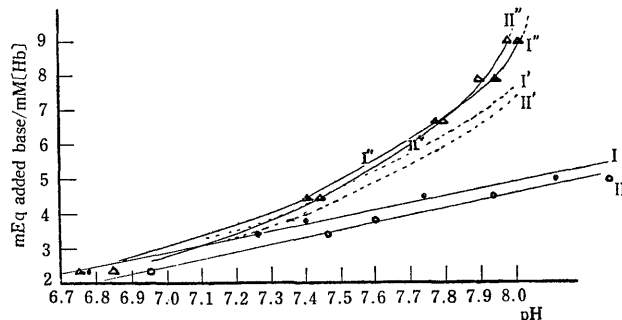
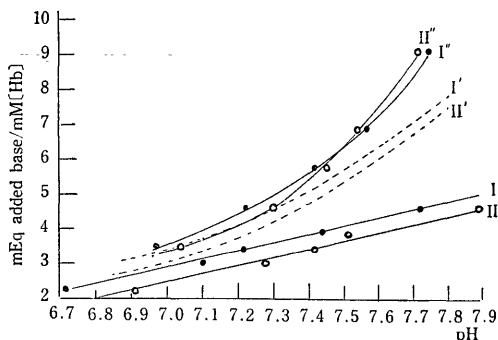


図3 O_2Hb 及び Hb を含む赤血球内容の滴定曲線



I	O_2Hb	$\text{Pco}_2=0$ -実測値	II'	Hb	$\text{Pco}_2=38\text{ mmHg}$ -計算値
II	Hb	$\text{Pco}_2=0$ -実測値	I''	O_2Hb	$\text{Pco}_2=38\text{ mmHg}$ -実測値
I'	O_2Hb	$\text{Pco}_2=38\text{ mmHg}$ -計算値	II''	Hb	$\text{Pco}_2=38\text{ mmHg}$ -実測値

図4 O_2Hb 及び Hb を含む赤血球内容の滴定曲線

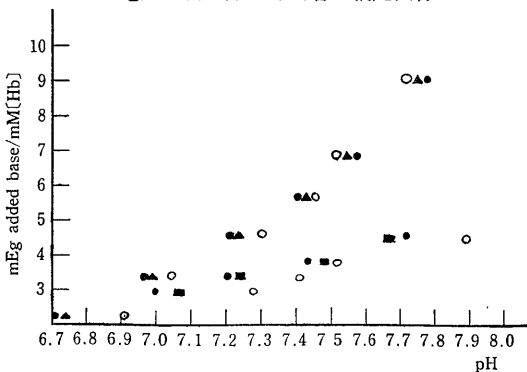


I	O_2Hb	$\text{Pco}_2=0$ -実測値	I'	O_2Hb	$\text{Pco}_2=50\text{ mmHg}$ -計算値
II	Hb	$\text{Pco}_2=0$ -実測値	II'	Hb	$\text{Pco}_2=50\text{ mmHg}$ -計算値
I''	O_2Hb	$\text{Pco}_2=50\text{ mmHg}$ -実測値	I''	O_2Hb	$\text{Pco}_2=50\text{ mmHg}$ -実測値
II''	Hb	$\text{Pco}_2=50\text{ mmHg}$ -実測値	II''	Hb	$\text{Pco}_2=50\text{ mmHg}$ -実測値

表1 O₂Hb 及び Hb を含む赤血球内容の分子緩衝価 (mM/l. pH)

NO.	Hb 量 mM/l	赤血球内容の分子緩衝価	
		mEg[HbO ₂] mM(HbO ₂) _T mM/l. pH	mEg[Hb] mM(Hb) _T mM/l. pH
1	15.67	2.92	2.75
2	18.03	2.75	2.71
3	19.10	2.10	2.00
4	19.56	2.05	2.08
5	15.67	2.54	2.14
6	19.67	2.20	2.23
7	18.76	2.45	2.38
8	16.42	2.31	2.60
9	16.99	2.37	2.25
10	13.97	2.30	2.26
11	13.97		2.88
12	16.17	2.40	2.34
13	16.17	2.76	2.59
14	15.92	2.65	2.44
15	15.92	2.29	2.44
16	14.09	2.33	2.25
17	14.09	2.34	2.48
18	18.36	2.71	
19	17.51	2.32	2.49
20	17.51	2.09	2.51
21	18.83	2.14	2.30
22	18.83	2.30	
23	18.30	2.30	2.44
24	13.67	2.65	2.58
25	18.36	2.09	2.40
\bar{X}	16.87	2.39	2.42
S E	0.377	0.049	0.045
S D	1.887	0.242	0.216

図5 Pco₂=0 及び 50 mmHg のときの O₂Hb (●), Hb(○) 及び CO-Hb (▲: Pco₂=0, ■: Pco₂=50 mmHg) を含む赤血球内容の滴定曲線



多数の例では遂に交叉するに至る。それ以後は Hb 曲線が O₂Hb 曲線よりも上位を占める。すなわち O₂Hb より強い酸として振舞う。

実験17例中, Pco₂=38 mmHg, pH 7.5~8.0 で6例において, 両曲線が交叉し, 1例については交叉しなかった。また, Pco₂=50 mmHg では, 8例が交叉し, 2例が交叉しなかった。

図2, 3, 4に示された破線 I', II' は Pco₂ が38 または 50 mmHg に高められた場合, 赤血球内容に生ずる HCO₃⁻ の濃度を Henderson-Hasselbalch の式により Pco₂ と pH の値から算出し, これを Pco₂=0 なる場合の O₂Hb および Hb の滴定曲線 I, IIの上に上積みしたものである。この計算に用いられた pK₁' は前報¹³⁾で得た6.15を用いた。

CO₂の共存する場合にも O₂Hb と Hb が Pco₂=0の場合と同様の多価の弱酸として振舞うならば CO₂存在下の赤血球内容の滴定曲線は I', II' となる筈である。しかるに, 実測の滴定曲線 I'', II'' と I', II' の間に明らかなひらきを生じるのは CO₂ の存在により O₂Hb, Hb は共に強い酸に変化することを意味している。CO₂ の存在下に認められる O₂Hb と Hb の強酸化の本態に関してここで論ずることはできないが, 著者の所見は Roughton の実験所見と一致するから, 彼らにならって CO₂ と Hb または O₂-Hb の間に carbamino 化合物が形成される結果と一応考え, 曲線 I', II' と I'', II'' の間の垂直の距離が形成された carbamine 酸の中和に要した base の量と理解する。CO₂ 共存下における O₂Hb と Hb の強酸化 (carbamino 化合物生成) は pH が大きくなるほど顕著であり, また O₂Hb より Hb において, より顕著であることは, 図2, 3, 4からも明らかである。また表2では12例の実験で O₂Hb および Hb の pH 7.5, 7.6, 7.7, 7.8, 7.9 における CO₂ 存在による強酸化がとりまとめて示されている。O₂-Hb と Hb の強酸化の程度にはすべての pH において有意の差 (1%の危険率) が認められる。

II. CO-Hb を含む赤血球内容の滴定曲線

1. Pco₂=0 の場合

CO-Hb を含む赤血球内容の CO₂ の存在しない場合の滴定曲線は図5の■印のように表わされた。CO-Hb を含む赤血球内容の分子緩衝価は O₂Hb および Hb を含む赤血球内容のそれと, 殆んど変りなかった。

2. Pco₂=50 mmHg の場合

Pco₂=50 mmHg の場合における CO-Hb を含む赤血球内容の滴定曲線は図5の▲印に示されるように,

表2 $P_{CO_2} = 38$ と 50 mm Hg, pH 7.5~7.9 のときの R (deoxygenated Hb) と O (oxygenated Hb) を含む赤血球内容の carbamine 酸の中和に要した base の量 mM/l. mM [Hb]

	No.	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
pH	Hb	carbamine 酸の中和に要した base の量 mM/l. mM [Hb]												\bar{X}
7.5	R	0.6	0.55		1.1	2.3	0.4	1.9	1.0	0.3	1.4	0.4	1.0	1.0
	O	0.7	0.6		0.7	2.1	0.2	1.5	0.8	0.2	0.8	0.3	0.8	0.8
7.6	R	1.0	0.85	0.35	1.5	2.4	0.5	2.4	1.4	0.4	1.7	0.7	1.4	1.3
	O	0.9	0.75	0	0.8	2.3	0.3	1.9	1.1	0.2	1.2	0.4	1.1	0.9
7.7	R	1.4	1.45	0.5	1.9	2.6	0.55	2.9	1.7	0.5	2.2	1.0	1.7	1.5
	O	1.2	1.1	0.1	1.2	2.5	0.3	2.4	1.4	0.3	1.7	0.5	1.4	1.2
7.8	R	1.9	2.0	0.7	2.3	2.8	0.7	3.4	2.2	0.7	2.8	1.4	2.1	1.9
	O	1.6	1.8	0.3	1.6	2.7	0.5	2.9	1.8	0.3	2.2	0.7	1.7	1.4
7.9	R	2.6	2.8	1.2	2.9	3.1	1.2	4.1	2.6	0.9	3.5	1.9	2.6	2.5
	O	2.2	2.6	0.7	2.3	3.0	0.8	3.5	2.1	0.4	2.8	1.0	2.2	2.0

O_2Hb を含む赤血球内容の滴定曲線と同じようであった。この図より、また、CO-Hb としての赤血球内容の carbamine 酸の中和に要した base の量は O_2Hb のそれとほぼ同じ量と考えられる。

Ⅲ. methemoglobin を含む赤血球内容の滴定曲線

1. CO_2 の共存しない場合

Methemoglobin を含む赤血球内容の滴定曲線は図 6, 7, 8 の I に示されるように、 O_2Hb および Hb の場合と同様に生理的 pH 領域では直線とみなし得る。その分子緩衝価は表 3 に示されるように、平均すると 2.67 mM/l. pH ($n=11$, $SE=0.090$, $SD=0.298$) となった。これと O_2Hb および Hb を含む赤血球内容の分子緩衝価 2.39 と 2.42 mM/l. pH との間に有意の差が認められなかった。

2. $P_{CO_2}=50$ mmHg の場合

$P_{CO_2}=50$ mmHg になると、methemoglobin を含む赤血球内容の滴定曲線は図 7, 8 の×印のように表わされた。この図の破線 I' は図 2, 3, 4 と同様にして $P_{CO_2}=50$ mmHg のとき、赤血球内容に生ずる HCO_3^- の濃度を算出し、滴定曲線 I に上積みしたものである。

また表 4 では 6 例の実験で methemoglobin と Hb を含む赤血球内容の pH 7.4, 7.5, 7.6, 7.7, 7.8 における CO_2 存在による強酸化 (carbamin 化合物生成) がとりまとめて示されている。

Methemoglobin と Hb の強酸化の程度は、すべて

図 6 CO_2 の共存しないときの methemoglobin を含む赤血球内容の滴定曲線

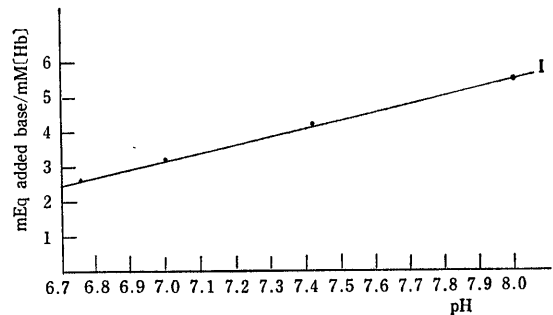


図 7 CO_2 の共存しないとき (I) と $P_{CO_2}=50$ mm Hg のとき (×印) の methemoglobin を含む赤血球内容の滴定曲線

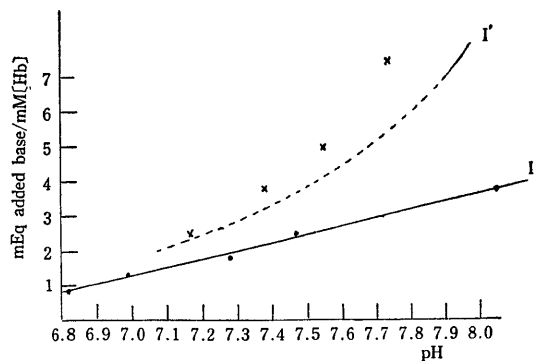


図8 Methemoglobin を含む赤血球内容の滴定曲線：
Hb量 14.0mM/l, Iは CO₂ の共存しないときの
滴定曲線, I' は Iに Pco₂=50 mmHg のときの
HCO₃⁻ の濃度を上積みした滴定曲線, × は Pco₂
=50 mmHg のときの実測値

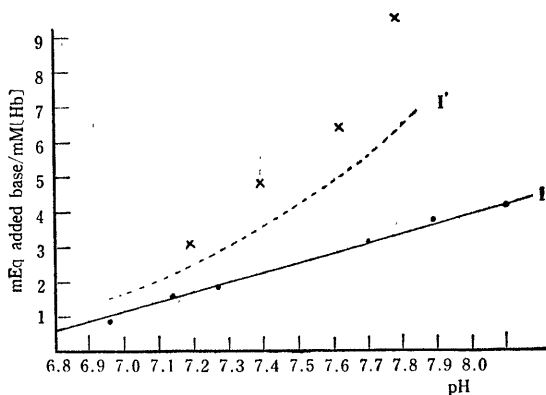


表3 Methemoglobin を含む赤血球内容の
分子緩衝価 (mM/l. pH)

	Hb 濃度 mM/l	met 化した赤血球内容の buffer value $\frac{[\text{met-Hb}]}{[\text{Hb}]}$ mM/l. pH
1	9.22	3.06
2	14.09	2.23
3	14.09	2.34
4	9.49	3.17
5	14.03	2.85
6	14.03	2.40
7	16.81	2.67
8	16.81	2.43
9	12.44	2.94
10	9.87	2.49
11	10.68	2.75
\bar{X}	12.87	2.67
S E	0.790	0.090
S D	2.619	0.298

表4 Pco₂ = 38と50 mm Hg, pH 7.4~7.8 のときの Met (methemoglobin) と
R (deoxygenated Hb) を含む赤血球内容の carbamine 酸の中和に要した
base の量 mM/l. H₂O mM [Hb]

No.	1	2	3	4	5	6	
pH	Hb	carbamine 酸の中和に要した base の量 mM/l. H ₂ O mM [Hb]					
7.4	Met	1.2	0.5	0.8	3.0	1.1	1.3
	R	0.8	0.2	0.2	1.0	0.8	0.5
7.5	Met	1.6	0.8	0.8	3.5	1.7	1.7
	R	1.1	0.5	0.3	1.5	1.3	0.9
7.6	Met	2.0	1.2	0.9	4.2	2.4	2.2
	R	1.4	0.8	0.4	1.8	1.7	1.1
7.7	Met	2.6	1.5	1.0	5.0	3.4	2.9
	R	1.7	1.2	0.5	2.2	2.2	1.5
7.8	Met	3.2	1.9	1.4	5.8	4.8	3.6
	R	2.1	1.6	0.7	2.7	2.8	1.9

の pH において, Hb よりも methemoglobin でより著明で, 有意の差が認められる。

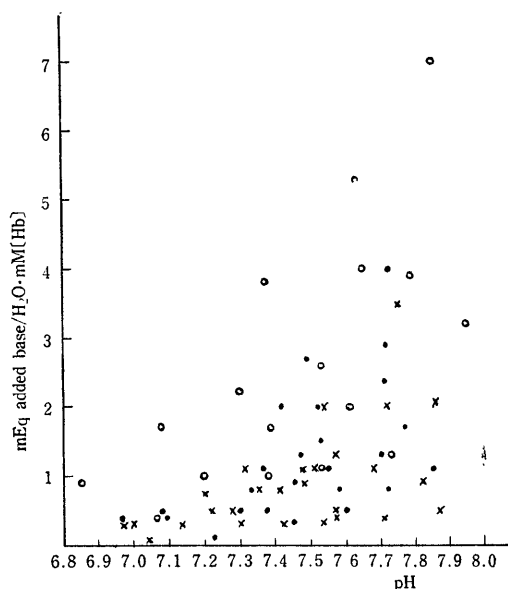
図9のように, carbamine 酸の中和に要した base の量は, methemoglobin, Hb, O₂Hb の順であった。

考 察

血液の酸塩基平衡において赤血球の果す役割は極めて大きい。したがって, 従来, 赤血球や色素の緩衝能を測定した研究は少なくない。表5はこれらの成績と著者の成績を取りまとめたものである。

ここにみられるように, 試料として各種動物の血色

図9 O₂Hb (×), Hb (●), Met-Hb (○) を含む赤血球内容の Pco₂=50 mmHg における carbamine 酸の中和に要した base の量 mEq/l. H₂O.mM(Hb)



素, 赤血球が用いられ, その実験条件, 測定法もまちまちである. したがって得られた Hb 1 mM 当りの緩衝価 (分子緩衝価と仮に呼ぶ) もまちまちである. ここに色素 1 分子は習慣上 Fe 1 原子を含むものであることはいうまでもない.

I. 強酸または強アルカリおよび CO₂ 滴定法による分子緩衝価

1. Hb 結晶の滴定曲線

Van Slyke ら¹⁾はウマの Hb 結晶で, Hb と酸素化の程度と Hb に結合した塩基の量との関係を次のようにあらわした.

$$\begin{aligned} \text{Hb}[\text{BHb}] &= \beta_o[\text{O}_2\text{Hb}][\text{pH}-a] + \beta_R[\text{Hb}_R][\text{pH}-b] \\ &= 2.64[\text{O}_2\text{Hb}][\text{pH}-6.59] + 2.45[\text{Hb}_R][\text{pH}-6.80] \end{aligned}$$

ここで [BHb] は Hb と結合した総塩基, 2.64 と 2.45 は O₂Hb と Hb の分子緩衝価で, 6.59 と 6.80 は定数である.

Hasting ら¹⁴⁾は Van Slyke ら¹⁾と同様, ウマとイヌの不活性 Hb 結晶で CO₂ の方法により, 分子緩衝価を求めた. pH は Henderson-Hasselbalch の式より算出した. 表 5 は pH 7.3 のときの分子緩衝価を示した.

Stadie ら¹⁵⁾¹⁶⁾はウマの Hb 結晶で, 強酸と CO₂ による滴定法とで, 分子緩衝価を求めて比較している.

表 5 O₂Hb と Hb の滴定曲線による分子緩衝価 (mM/l. pH)

但し, 河野, 西田の値では, 全血及び赤血球 Hb 量を 9.3, 20 mM/l として算出した.

実験者名	動物名	材料	滴定法	除 HCO ₃ ⁻ 処理	Hb 量 mM/l	分子緩衝価 β	
						O ₂ Hb	Hb
Van Slyke et al. (1922) ¹⁾	ウマ	Hb 結晶	強酸又は強アルカリ	(+)	6.92~8.87	2.64	2.45
Hasting et al. (1924) ¹⁴⁾	ウマ	Hb 結晶	強酸又は強アルカリ	(+)	5.19	2.7	2.6
Hasting et al. (1924) ¹⁴⁾	イヌ	Hb 結晶	強酸又は強アルカリ	(+)	4.3	2.4	2.0
Stadie et al. (1931) ¹⁵⁾	ウマ	Hb 結晶	強酸 (HCl)	(+)	4.94~5.92		2.46
German et al. (1937) ¹⁷⁾	ウマ	Hb 結晶	強酸又は強アルカリ	(+)	3.11	約	3.0
Stadie et al. (1937) ¹⁶⁾	ウマ	Hb 結晶	強酸又は強アルカリ	(+)	10.1		2.70
Stadie et al. (1931) ¹⁵⁾	ウマ	Hb 結晶	CO ₂	(-)	6.26		2.44
Stadie et al. (1937) ¹⁶⁾	ウシ	Hb 溶液	強酸 (HCl)	(+)	10.1	2.41	2.37
Stadie et al. (1937) ¹⁶⁾	ウシ	Hb 溶液	CO ₂	(-)	10.1		2.29
Adair (1925) ¹⁸⁾	ヒト	Hb 溶液	強酸又は強アルカリ	(+)	18.9	2.47	2.31
Van Slyke et al. (1923) ¹⁹⁾	ウマ	赤血球	CO ₂	(-)	5.53	3.6	3.35
Dill et al (1937) ²⁰⁾	ヒト	赤血球	CO ₂	(-)	19.6	3.425	3.125
西田 (1957) ²¹⁾	ヒト	赤血球内容	強酸又は強アルカリ	(-)	(20)	(3.08)	
西田 (1957) ²¹⁾	ウサギ	赤血球内容	強酸又は強アルカリ	(-)	(20)	(3.80)	
著者の実験成績	ウシ	赤血球内容	強アルカリ (NaOH)	(+)	16.87	2.39	2.42
Van Slyke et al. (1933) ²²⁾	イヌ	全血	CO ₂	(-)	7.20~10.0	2.70	2.54
河野 (1934) ²³⁾	ウマ	全血	強酸又は強アルカリ	(-)	(9.3)	(2.28)	

German ら¹⁷⁾ はガラス電極を用いて、CO₂ free で、25°C のとき、ウマの Hb 結晶で、O₂Hb と Hb の滴定曲線を pH 4.3~9.5 の領域で求めている。両曲線を数式で示すと

$$[\text{O}_2\text{Hb}]\text{mEq} = \beta_o [\text{O}_2\text{Hb}]\text{mM} (\text{pH} - \text{pI}_o)$$

$$[\text{Hb}]\text{mEq} = \beta_r [\text{Hb}]\text{mM} (\text{pH} - \text{pI}_r)$$

[]mEq は荷電の濃度, []mM は総濃度, β_o も β_r も 2.8~3.1 となる。pI_o と pI_r はそれぞれ 6.6, 6.8 とすることができる。

2. Hb 溶液の滴定曲線

Adair¹⁸⁾ はヒトの Hb 溶液で脱 HCO₃⁻ 処理を行ない、NaOH 滴定法で、分子緩衝価を求めている。

Stadie ら¹⁶⁾ はウシの Hb 溶液で HCl と CO₂ による滴定法とで、分子緩衝価を求めている。CO₂ 滴定法と HCl 滴定法とで分子緩衝価はほぼ一致し、CO₂ 滴定法では carbamate が CO₂ と結合して存在することを確かめた。

3. 赤血球の滴定曲線

Van Slyke ら¹⁹⁾ はウマの赤血球で、CO₂ 滴定法により、O₂Hb と Hb の分子緩衝価を求め、それぞれ、3.6 と 3.35 mM/l. pH であった。Van Slyke ら¹⁹⁾ のウマ Hb 結晶の分子緩衝価 2.6 と 2.45mM/l. pH よりも緩衝価が大きいのは、結合リン酸のような、他の非拡散性物質によるものと述べている。

Dill ら²⁰⁾ はヒトの赤血球で、CO₂ 滴定法により滴定曲線を求めている。O₂Hb 滴定曲線より

$$\text{BPc} = \text{O}_2\text{Hb} [-0.5(\text{pHc})^2 + 10.625\text{pHc} - 48.46]$$

また、Hb 滴定曲線より

$$\text{BPc} = \text{Hb} [-0.24(\text{pHc})^2 + 6.207\text{pHc} - 31.97]$$

という式が成り立つとしている。

BPc は Hb および他の赤血球非拡散性物質に結合した塩基の量で mEq で表わされる。

ここでは pH が 7.20 のときの分子緩衝価を表 5 に示した。

西田²¹⁾ はヒトとウサギの赤血球内容について、除 HCO₃⁻ 処理を行なわないで、流動パラフィン下で、強酸または強アルカリ滴定法より、緩衝価を求めている。

4. 全血の滴定曲線

Van Slyke ら²²⁾ は CO₂ 滴定法で、イヌの全血で O₂Hb と Hb の分子緩衝価を求め、イヌの全血の緩衝価はウマの全血のそれよりも少ないと報告している。また、ウマとイヌの全血の緩衝価の差はそれらの Hb の緩衝価の差と近似しているという。なお、緩衝価を $-d[\text{BHCO}_3^-]/d\text{pH}$ であらわし、 $[\text{HCO}_3^-]$ は $[\text{CO}_2]_T$ と $[\text{CO}_2]$ との差としている。

河野²³⁾ はウマの全血で、ガラス電極を用いて強酸または強アルカリ滴定法で、流動パラフィン下で緩衝価を求めた。血漿の緩衝価と算出した赤血球の緩衝価を比較している。

従来の成績をみると、結晶 (Van Slyke ら¹⁹⁾, Hasting ら¹⁴⁾, Stadie ら¹⁵⁾¹⁶⁾, German ら¹⁷⁾), Hb 水溶液 (Stadie ら¹⁶⁾, Adair¹⁸⁾) の分子緩衝価は赤血球 (Van Slyke ら¹⁹⁾, Dill ら²⁰⁾, 西田²¹⁾) のそれに比して小さい傾向が認められ、この差は、Van Slyke ら¹⁹⁾ や Dill ら²⁰⁾ が非拡散性物質によるというように、赤血球 Hb 以外の構成成分の緩衝価に基因するものと考えられる向きもあるが、著者は重炭酸イオンを完全に除去した赤血球を強塩基で滴定した場合には表 I のように O₂Hb と Hb を含む分子緩衝価はそれぞれ、2.39 および 2.42 mM/l. pH で、結晶 Hb のそれと殆んど差を認めなかった。

したがって、CO₂ free の赤血球の緩衝能はその殆んどすべてが血色素の緩衝能に依存するものと考えられる。一方従来赤血球で得られた大きな緩衝価 (Van Slyke ら¹⁹⁾, Dill ら²⁰⁾, 西田²¹⁾) はこれに含まれる重炭酸緩衝系に原因するものと推定される。この表 5 の赤血球の成績にみられるとおり、生理的状態にある赤血球では緩衝物質として Hb の外に HCO₃⁻ を多量に含有するからこれを無視することはできない。この除 HCO₃⁻ 処理を行っていない赤血球は Hb 単独の緩衝能よりはるかに大きい緩衝能を示している。

CO₂ による滴定と強酸・強塩基による滴定の成績 (Stadie ら¹⁵⁾¹⁶⁾) は重炭酸塩をあらかじめ除去された Hb 溶液については差を認めない。この所見は一見著者の所見 (例えば図 2, 3, 4 の所見) と矛盾するように思われるが、CO₂ による滴定の場合には、試料の Pco₂ の上昇に伴い Hb の carbamino 化合物形成が増大する。反面 pH の低下に伴い carbamino 化合物の形成は減少し、両者の効果が相殺して、Pco₂ の変動による carbamino 化合物の量に著変を生じないものと考えられる。

II. Pco₂=38 および 50 mmHg のときの滴定曲線

次に滴定に用いる試料の Pco₂=38 または 50 mm Hg の水準にはば一定に保った場合、得られる滴定曲線は図 2, 3, 4 の I', II' のようになり、pH の高い領域では両者は一般に交叉する。これらの所見は Roughton らの得た成績と定性的に一致した。

CO₂ 共存下の試料においても Hb や O₂Hb が CO₂ free の場合と同様の多価弱酸として滴定に反応するものとすれば、CO₂ 共存下の試料の滴定曲線は I',

Ⅱ' となる筈である。これらの予測曲線と実測曲線Ⅰ'', Ⅱ'' の間に明らかなひらきを生じたのは O_2Hb や Hb が CO_2 の存在下ではより強い酸に変化し、したがってその中和により多くの塩基を要したことを意味している。この強酸化は Roughton らのいうように Hb の NH_2 基が CO_2 と結合して carbamine 酸塩基を生じたためであろう。元来 O_2Hb は Hb に比してより強い酸として振舞い、これは O_2Hb と Hb の滴定曲線の上下のへだたりで示されるが、このへだたりは CO_2 の共存によって減少し、 pH の高い領域ではその位置が逆転する。この事実は CO_2 共存下における Hb の強酸化の程度は表 2, 図 9 のように、 O_2Hb の強酸化より強いこと (Ferguson ら²⁴⁾²⁵⁾, Stadie¹⁶⁾, Wyman²⁶⁾, 養口²⁷⁾ を意味し、また pH の高い領域では Hb が O_2Hb より強い酸となること (Roughton⁶⁾⁸⁾⁹⁾ を物語るものである。

成書では組織毛細血管が CO_2 を収容する際に生ずる血液の酸性化が O_2Hb の還元による弱酸化によって大いに消却されると述べているが、この説明には無 CO_2 状態における O_2Hb と Hb の酸としての強さの差すなわち滴定曲線のひらきを論拠としている。しかし生体内ではほぼ $40\sim 45\text{mmHg}$ の P_{CO_2} が維持されているから、このような環境下では O_2Hb と Hb の酸としての強さの差すなわち滴定曲線のひらきの差は決して大きくない。したがってこの説明の論拠は薄弱となる²⁸⁾。

Ⅲ. CO を含む赤血球内容の滴定曲線

Stadie ら¹⁵⁾は、 CO_2 滴定法と HCl 滴定法とで、 $CO-Hb$ の分子緩衝価はほぼ一致したという所見を報告している。著者の実験でも、赤血球を CO と接触させてその Hb を $CO-Hb$ として、上と同様無 CO_2 状態および P_{CO_2} 50mmHg の下で滴定曲線を求めた結果は図 5 のように、 O_2Hb の場合と全く同一であった。

Ⅳ. methemoglobin を含む赤血球内容の滴定曲線

Hb を酸化して methemoglobin とした場合無 CO_2 状態における滴定曲線の slope 2.67mM/L.pH ($n=11$, $SE=0.090$, $SD=0.298$) には O_2Hb や Hb の分子緩衝価 2.39 と 2.42mM/L.pH との間に有意の差を説明し得ないが、 CO_2 共存下における強酸化の度合には、表 4, 図 9 のように O_2Hb や Hb のそれと比較して大きく、有意の差を認めた。(養口²⁷⁾)

その理由は明らかではないが、heme の Fe^{++} の酸化によって Hb 分子内の $-NH_3^+$ の解離が促進されるか、或いは carbamino 化合物生成が促進されるのかも知れない。

総 括

ウシの溶血した赤血球を試料として Roughton らの実験を追試した。試料の Hb の酸素化および還元したものについてその P_{CO_2} を 0 , 38 , 50mmHg に調製しつつ、強アルカリで滴定し、滴定曲線を作製した。その結果、Roughton らの所見を追証する成績を得た。また、methemoglobin 或いは一酸化炭素 hemoglobin を含む赤血球内容の滴定曲線を上と同様の方法で作製した。

1. 重炭酸イオンを完全に除去した赤血球のヘモグロビンの分子緩衝価は結晶 Hb のそれと殆んど差を認めなかった。 O_2Hb および Hb を含む赤血球内容の分子緩衝価は 2.39 と 2.42mM/L.pH となった。

2. $P_{CO_2}=38$ と 50mmHg で O_2Hb と Hb を含む赤血球内容の滴定曲線は pH 増大と共に急激に増大し、かつ次第に接近し、 pH $7.5\sim 8.0$ で交叉し、それ以後は Hb 曲線が O_2Hb 曲線よりも上位を占める。すなわち、 Hb が O_2Hb よりも強い酸として振舞う。

3. CO_2 の存在しない場合、 $CO-Hb$ および methemoglobin を含む赤血球内容の分子緩衝価は O_2Hb や Hb を含む赤血球内容のそれと有意の差を認めないが、 CO_2 共存下で強酸化の度合を比較すると、methemoglobin を含む赤血球内容が O_2Hb や Hb のそれよりも大きく、 $CO-Hb$ 含有赤血球内容の強酸化の度合は O_2Hb の場合と同一であった。

稿を終るに当たり、御指導と御校閲を賜った恩師齋藤幸一郎教授並びに佐川一郎教授に心から感謝します。さらに有益なる御助言と御協力をいただいた本田良行助教授、高野成子博士、安田実博士および第一生理学教室員諸氏に感謝いたします。

文 献

- 1) Van Slyke, D. D., Hasting, A. B., Heidelberger, M. & Neil, J. M. : J. Biol. Chem., 54, 481 (1922).
- 2) Davenport, H. W. : The ABC of Acid-base Chemistry, 4th ed., p. 43, Chicago, The University of Chicago Press, 1963.
- 3) Pitts, R. F. : Physiology of the Kidney and Body Fluids, p. 152, Chicago, Year Book Medical Publishers Incorporated 1963.
- 4) Woodbury, F. W. : Physiolgy and Biophysics, Ruch, T. C. & Patton, H. D. (Ed.), 9th ed., p. 901, Philadelphia and London, W. B. Saunders Co., 1965.
- 5) Keele, C. A. & Neil, E. :

Samson Wright's Applied Physiology, 11th ed., p. 170, Oxford, Oxford University Press, 1965.

6) Rossi, L. & Roughton, F. J. W. : Boll. Soc. Ital. Biol. Sper., 38, 1677 (1962).

7) Roughton, F. J. W. : Oxygen in the Animal Organism, Dickens, F. & Neil, E. (Ed.), p. 18, London, 1963.

8) Roughton, F. J. W. : Handbook of Physiology, p. 767, Washington, D. C., American Physiological Society, 1964.

9) Rossi-Bernardi, L. & Roughton, F. J. W. : J. Physiol., 189, 1 (1967).

10) Everyn, K. A. & Malloy, H. T. : J. Biol. Chem., 126, 655 (1938).

11) Henry, R. J. : Clinical Chemistry, p. 753, A Hoeber-Harper International Reprint 1965.

12) 斎藤幸一郎・本田良行 : 日新医学, 42, 167 (1955).

13) 石川克巳 : 十全医会誌, 77, (1968).

14) Hasting, A. B., Van Slyke, D. D., Neil, J. M., Heidelberger, M. & Harington, C. R. : J. Biol. Chem., 60, 89 (1924).

15) Stadie,

W. C. & O'Brien, H. : Biochem. Zschr., 237, 290 (1931).

16) Stadie, W. C. & O'Brien, H. : J. Biol. Chem., 117, 439 (1937).

17) German, B. & Wyman, J. : J. Biol. Chem., 117, 533 (1937).

18) Adair, G. S. : J. Biol. Chem., 63, 517 (1925).

19) Van Slyke, D. D., Wu, H. & McLean, F. C. : J. Biol. Chem., 56, 765 (1923).

20) Dill, D. B., Edwards, H. J. & Consolazio, W. V. : J. Biol. Chem., 118, 635 (1937).

21) 西田悦郎 : 日本生理誌, 19, 32 (1957).

22) Van Slyke, D. D. & Sendroy, T. J. : J. Biol. Chem., 102, 505 (1933).

23) 河野純三 : 京医誌, 31, 567 (1934).

24) Ferguson, J. K. W. & Roughton, F. J. W. : J. Physiol., 83, 87 (1934).

25) Ferguson, J. K. W. : J. Physiol., 88, 40 (1936).

26) Wyman, J. : 文献27) より引用.

27) 養口 真 : 十全医会誌, 65, 49 (1960).

28) 斎藤幸一郎 : 呼吸と循, 15, 193 (1967).

Abstract

The experiments of Rossi and Roughton were reexamined as to hemolyzed bovine red cells. The titration curves of oxygenated and reduced red cells in absence of CO_2 , at $\text{Pco}_2=39$ and 50 mmHg were obtained by strong alkalimetric titrations and the observations of Roughton et al. were confirmed. Moreover, the titration curves of red cells containing carboxyhemoglobin or methemoglobin were made in absence of CO_2 and at $\text{Pco}_2=50$ mmHg. The results obtained were as follows.

1. Molar buffer value of Hb in hemolyzed red cells in absence of bicarbonate ions was approximately similar to that of crystallized hemoglobin. Molar buffer values of Hb in oxygenated and reduced red cells were 2.39 and 2.42 mM/1·pH respectively.

2. Extending to more alkaline pH and $\text{Pco}_2=38$ to 50 mmHg, the two titration curves were steepened up, closed and crossed each other in the pH range of 7.5 to 8.0. Above this pH range, the reduced red cells actually goes more alkaline rather than more acid when oxygenated at constant $\text{Pco}_2=38$ and 50 mmHg. The amount of carbamino-bound CO_2 in reduced red cells was greater than in oxygenated red cells.

3. In absence of CO_2 , molar buffer values of Hb in red cells containing carboxyhemoglobin or methemoglobin were similar to those of Hb in oxygenated and reduced red cells. In presence of CO_2 , however, the amount of carbamino-bound CO_2 in red cells containing methemoglobin was greater than in oxygenated and reduced red cells, while the amount of carbamino-bound CO_2 in red cells containing carboxyhemoglobin was similar to that of oxygenated red cells.