

## 遠心限外濾過法による血漿アルブミンと パラアミノ馬尿酸の結合に関する研究

金沢大学医学部第一生理学教室(主任 齋藤幸一郎教授)

楽 満 一 夫

(昭和35年7月25日受付)

パラアミノ馬尿酸(以下 PAH と略す)はフェノールレッド, Diodrast 等と共に腎臓機能の臨床検査乃至基礎的研究のために重要な物質であり, いずれも血漿アルブミンと結合する<sup>1)2)</sup>とされているが, 就中 PAH は低水準の血漿中濃度において Diodrast とクリアランスが同一であり, 化学的定量が簡単であつて血漿及び尿の内因性の Blank が殆んどなく, *in vivo* で人の赤血球膜を透過せず, それ自体無毒である, 等の長所の故に Diodrast に取つて換わるものとして特に重用されている<sup>3)4)</sup>.

扱て蛋白質と他の種々の物質との結合を調べる際に, この結合によつて可溶性の複合物をつくる場合には(血漿アルブミンと PAH の結合のように), 従来非常に多くの方法が工夫されている。それらに関しては字井<sup>5)</sup>, Klotz<sup>6)</sup>, Goldstein<sup>7)</sup>等の綜説の中によくまとめられているが, そのうち限外濾過法は殊に血漿(又は血清)水分中の限外濾過性成分を調べるにあつてその water phase を分離採取した上直接分析出来る方法であり, 又一方, 腎臓における糸球体濾過の現象が血圧と糸球体毛細血管壁とによる血液 water phase の限外濾過にはかならぬことを想起すると, 誠に興味深い手段であるといえよう。

そこで従来各種の限外濾過装置が考案されているが, 同時に随伴する技術的困難さと短所との故にその利用範囲は自ら限定されている<sup>8)9)</sup>。しかしこれらの限外濾過法の中で従来比較的人々の注意を惹くことの少なかつた“遠心力を利用して加圧濾過する方法”(所謂遠心限外濾過法)が当教室において採り上げられ, 普通の遠心器を使用し血漿(又は血清)の濾過に適した微量用迅速限外濾過装置が考案され各種の定量的実験に駆使されている<sup>8)9)10)</sup>。

著者はこの遠心限外濾過法を応用して前述の血漿アルブミンと PAH の結合関係を可及的生理的条件下に

定量的に追究し(本法により得られる unfiltrable PAH はアルブミンに結合して存在するものと仮定する), 化学量論的立場からその生理学的意義を明確ならしめると共に Klotz<sup>6)</sup>が述べているように“分子論的な考え方を生物学的変化に導入する橋”としての“蛋白質の結合の原理”についてその一端の解明に寄与せんとした。

この目的のために, PAH ソーダを添加した人, 牛, 家兎, 犬の各血漿を試料として本装置を応用し, 試料の温度, pH, pCO<sub>2</sub>等の諸条件を可及的生理的範囲内に保持し, しかも僅々10分間程度の短時間内に遠心限外濾過を完了し, 微量定量法を以て限外濾液及びその他の分析を実施した。つまり PAH の血流内投与を受けた生体の腎糸球体における生理的限外濾過の過程を *in vitro* において著しく近似的に再現した訳である。

如上の実験の結果, 犬血漿の場合を除き, 他の3者即ち牛, 人, 家兎の各血漿について夫々血漿アルブミンと PAH との結合は生理的条件下においても質量作用の法則に準拠し化学量論的に取扱われるべきものであることを実証し得た。

従つて又腎機能検査法の一つである尿細管分泌極量測定に際して必要な遊離の(血漿アルブミンと結合しない, 換言すれば限外濾過性の) PAH の割合(血漿中総量に対する)も被検個体の血漿総蛋白濃度, 血漿アルブミン濃度, 及び血漿 PAH 濃度の3要素を与えられれば以下理論的にこれを算出し得るに至つた。

### I 試料, 実験装置並びに実験方法

遠心限外濾過法自体については既に齋藤・蓮村<sup>9)</sup>, 及び菓子井<sup>8)10)</sup>が詳述しているのでここでは著者の実験に当つて特に配慮された個所について述べることにする。

#### A. 試料

Studies on the Bindings of Plasma Albumins and Paraamino-hippurate by the Centrifugal Ultrafiltration. Kazuo Rakuman, Department of Physiology (I) (Director: Prof. K. Saito), School of Medicine, University of Kanazawa.

人、家兎、犬の各血漿は Anticoagulant 溶液を 10 vol. % の割合で混合せしめるようにして予め嫌氣的に採血した全血より更に嫌氣的に遠心分離され、しかる後夫々所定量の注射用 10% PAH ソーダが添加された。

牛血漿の場合は、屠殺後直ちに放血される牛全血に直ちに Anticoagulant 溶液を同じく 10 vol. % の割合に混合せしめ、後遠心し血漿が分離されたがこれらの操作はすべて非嫌氣的に行われた点が上述の人、家兎並びに犬の場合とは違っている。

なお Anticoagulant には人の場合においてのみ 10% 輸血用枸橼酸ソーダ水溶液を用い、他の 3 者の場合にはいずれも 2% 碳酸カリ水溶液によつた。

### B. 実験装置

濾過装置の詳細は殆んど齋藤・蓮村<sup>9)</sup>、及び菓子井<sup>9)10)</sup>の述べている通りであるが、唯濾膜を載せる目皿の辺縁部で濾膜を介してゴムパッキングに接触する部分には目穴を開けぬようにしたのは勿論更にその他の部分の目穴の縁も若干削り落ちて鈍化せしめた。この理由は、そもそも遠心限外濾過中の試料漏出の原因の大部分がパッキング部において起り、しかも目皿の全面に一樣に目穴を穿孔するときはパッキングで濾膜を目皿に対して圧迫する際に目穴に向つて膨出しようとするパッキングゴムと鋭い直角の目穴の縁とによる濾膜の損傷が最も多いほか、遠心途中においては濾膜が試料の遠心加圧のために目穴の中へと膨出しようとして同じく穴の縁で損傷される恐れがある故である。

又て遠心限外濾過に用いられる濾膜の中で、強韌で且つ取扱いに便利であり特にその濾過の速さにおいて断然他の追従を許さぬものは当教室の和紙コロジオン膜<sup>9)10)</sup>であり、我々の遠心限外濾過法の長所を最もよく発揮させるものであるが、唯これを PAH の限外濾過に使用するには一応次のような事柄に触れて置かねばならない。即ち先ず第一に濾膜中に含まれる水分による濾液の稀釈であり、次には濾膜と PAH との結合乃至は H. W. Smith<sup>2)</sup>の述べているように濾膜コロジオンのニトロ基によつて PAH のアミノ基が酸化されるという懸念等である。けれども要するにこれらの事柄は実際の定量に當つて濾液 PAH 濃度を血漿中限外濾過性 PAH 濃度よりも幾許か過少に見積らせる(理想的限外濾過が遂行された場合には両者の値は一致すべきである)原因になるということに外ならない。

従つてこの解決は上述のような濾膜の濾液 PAH 濃度に対する干渉の程度を予備実験から求めて置いて測定値の補正を行うか、或いは又斯かる干渉が實際上無

視し得る程度に迄軽減せられるような濾膜を用意若しくは調製するか、のいずれかによつて与えられる筈である。

著者は齋藤・蓮村の“改良された和紙コロジオン膜(所謂標準濾膜)<sup>9)</sup>”を用いることによつて上述の後者による解決を得ることが出来た。

遠心操作のためには恒温箱中で普通遠心器を使用した。これによつて遠心が余り長時間に亘らぬ限り室温 $\sim 37^{\circ}\text{C}$ の範囲の任意の温度で遠心限外濾過を行うことが可能である。

### C. 実験方法

濾膜を装着した限外濾過装置の上節に流動パラフィン<sup>9)</sup>を 2 $\sim$ 3 cm の高さに注ぎ、この流動パラフィンの下に試料 5 又は 10ml を嫌氣的に収容し、装置を恒温箱内の遠心器に移して 2500 R.P.M.  $\times$  10 分間所定の温度で遠心する。

室温より高い温度で遠心せねばならぬ場合には試料自身は勿論装置全体を予め所定の温度に温めておかねばならない。

後に詳述するが、血漿アルブミンと PAH の結合に及ぼす温度の影響は著しく大きいから遠心の際には温度の正確な調節が必要である。

なお非嫌氣的遠心(流動パラフィンが試料の上に重畳されていない)の際には限外濾過装置上節管口をビニールフィルム等で被覆して遠心における水分蒸発による試料の濃縮を防がねばならない。

試料の中で牛血漿の如きは終始非嫌氣的操作を行つて得られたものであるから、CO<sub>2</sub>の脱出によつてその pH は正常値よりかなりアルカリ側に傾いている。そこでこのような場合には、pCO<sub>2</sub>若しくは pH を調節するために 5% (若しくはそれ以上)の CO<sub>2</sub>を含む空気と平衡させることにした。著者はこの目的のために 100ml エルレンマイエルコルベンにゴム栓を施し、このゴム栓に長短 2 本の細い硝子管を通し、これらに細いゴム管を連結して夫々ガスの出入路となしトノメーターの代用に供した。

試料をガスと平衡させるに當つて消泡剤として便利なオクチールアルコールがあるが、これは血漿蛋白と PAH の結合を著しく阻碍するので使用出来ない。

血漿蛋白と PAH の結合に及ぼす pH の影響を調べる際には、最も血漿の pH の低い所は CO<sub>2</sub> 約 20% を含む空気と平衡させることにより室温で pH 6.8 附近迄得られ、高い所は血漿中に溶存するガス(特に CO<sub>2</sub>)を吸引排除することにより室温で pH 8.5 附近迄得ることが出来るので、この範囲で生理的 pH 領域をも含めて生物学的には充分な pH の幅を以て検討す

ることが出来た。

なお血漿 pH の測定は齋藤・本田の微量用 I 型又は U 型硝子電極<sup>16)</sup> を使用して室温下に測定を行い、必要に応じて血漿の pH の温度係数<sup>16)</sup> ( $-0.0110$ ) から所要温度における pH 値に換算した。この  $-0.0110$  という値は人血漿について求められたものであるが、牛、家兎、犬の各血漿の pH の温度係数も亦これに等しいとして換算を行った。

PAH の化学的定量の原理は試料の除蛋白濾液 (又は遠心上清) に塩酸及び亜硝酸ソーダを加えて PAH をジアゾ化し、更に N-(1-naphthyl) ethylenediamine-dehydrochloride と会合発色せしめた後これを光電比色するに在り、著者はこの原理に基く方法の中で N. Kalant 等<sup>11)</sup> の微量変法に従った。

血漿蛋白の定量には Gornall 等<sup>12)</sup> の改良した Biuret 法により、血漿アルブミン定量には 23% 硫酸ソーダを用いて血漿アルブミンを分別し<sup>13)</sup>、然る後 Biuret 法に従った。

なお血漿アルブミンの分子量は人、牛、家兎、犬共に 70,000 と仮定した。

血漿総蛋白濃度が Biuret 法によつて求められると血漿水分含有量を簡単に而もかなり正確に算出することが出来る。

著者も菓子井<sup>8)</sup>と同様に McLean and Hastings<sup>14)</sup> に倣い次式①を用いて血漿総蛋白濃度 P (gm/dl) から血漿水分含有量 W (gm/dl) を算出した。

$$W = 99.0 - 0.75 \times P \dots \dots \dots \textcircled{1}$$

かくして計算された W 値は血漿の場合乾燥重量法によつて求められた値とよく一致する。

結合 PAH 量を知るためには血漿及びその限外濾液について双方の溶質 (PAH) 濃度の差を求めねばならぬが、血漿中においては蛋白質が普通その全体積の数%以上を占めているから血漿とその限外濾液の溶質濃度を比較するには双方共にこれを“単位水分量当りの溶質量” mg/100gmH<sub>2</sub>O 或いは mg/kgH<sub>2</sub>O 等を以て表わさねばならない。而して血漿のそれは菓子井<sup>8)</sup>が述べているように或る溶質の血漿中濃度を a mg/dl とすると  $\frac{100 \times a}{W}$  mg/100gmH<sub>2</sub>O で表わされることになる。

次に限外濾液のそれは今その濃度が ar mg/dl であるならば、この数値を以て直ちに単位水分量当りの溶質量 ar mg/100gmH<sub>2</sub>O として表わしても差支えない。

これは次のような理由に基く。今限外濾液の比重を測定し (比重管を用いる微量法<sup>15)</sup>) これを G とする。そして乾燥重量法による含有水分量の重量%を M とすると、求める単位水分量当りの溶質量は  $\frac{ar \times 100}{GM}$  mg/100gmH<sub>2</sub>O で表わされる。

ところで G の値は普通 1.010 前後、M の値は 99% 前後であり、しかも G、M の値はその増減が相反しているから  $GM \approx 100$  となり、従つて  $\frac{ar \times 100}{GM} \approx ar$  としてもそれに基く誤差は實際上無視し得る程度である。

## II 実験成績

A. 血漿アルブミンと PAH の結合に及ぼす pH、PAH 濃度及び温度の影響

(1) PAH ソーダを添加した牛血漿を CO<sub>2</sub> 約 5%

Table 1. Comparison of the amounts of bound PAH obtained by aerobic and anaerobic centrifugal ultrafiltration

	Concent. of Plasma protein gm/dl	Concent. of PAH in Plasma mg/100gmH <sub>2</sub> O	Concent. of PAH in Ultrafiltrate mg/100gmH <sub>2</sub> O	Bound PAH mg/100gmH <sub>2</sub> O	% of Bound PAH %	Plasma pH (Room temp.)	Room temp. °C
1	7.6	34.6	—	30.3	4.3	12.4	18
			G	29.2	5.4	15.6	
2	6.6	38.9	—	35.6	3.3	8.4	17
			G	34.2	4.7	12.0	
3	6.9	35.0	—	30.5	4.5	12.8	16
			G	30.0	5.0	14.2	
4	6.2	29.7	—	25.0	4.7	15.8	17
			G	24.2	5.5	18.5	

(—) aerobic

(G) anaerobic

を含む空気と平衡させたもの (G) と、しからざるもの (一) とに分け、前者を嫌氣的に後者を非嫌氣的に遠心限外濾過したもの 4 例が第 1 表である。後者の pH は前者のそれよりかなりアルカリ側に偏している。しかも結合 PAH の割合 (血漿中総量に対する) は前者の方が有意に大きい。

同じく PAH を添加した牛血漿 5 例を使用し、所要の割合に CO<sub>2</sub> を含む空気と平衡させることによつて pH を調節して段階的に高低の差をつけ、嫌氣的遠心限外濾過を行い pH の差に基く結合 PAH の割合の変化を調べると第 2 表及び図 1 のようになる。

概観して pH 6.8~8.5 の範囲で結合 PAH の割合は試料の pH に略々反比例するように見える。しかし pH の生理的変動の幅 (0.2) 内における結合 PAH の割合の消長は平均して僅々 0.7% 以内に過ぎないから、限外濾過が生理的 pH の範囲内で行われるような場合には pH の差に基く結合 PAH 量の変動は實際上懸念せずに済むものと考えられる。

次に同様の実験を人血漿 5 例について体温 (37°C) において稍々詳しく試みたところ結果は図 2 のようになつた。ここに、 $\gamma = \frac{\text{結合 PAH モル数}}{\text{血漿アルブミンモル数}}$  であつて結合 PAH 量のパラメーターとして理論的に最も妥当なものである。而して図 2 の (A) は図 1 の場合に依つて結合 PAH の割合 (血漿中総濃度に対する) を試料 pH に対して plot したものであり、(B) は同一実験結果を  $\gamma$  と試料の pH との関係によつて表示し理

論的取扱いに便ならしめたものである。

この実験では前述の牛血漿について行われた場合と相違して pH 6.4 附近から pH 7.8 附近の範囲で結合 PAH 量は pH に比例すると見做すことが出来る。今最小自乗法により回帰方程式を求めると、

$$\gamma = -0.004561 + 0.067606 \text{ pH} \dots\dots\dots \textcircled{2}$$

を得、この際  $\frac{\Delta\gamma}{\Delta\text{pH}} = 0.067$  である。しかしながら pH の生理的変動の範囲内における結合 PAH 量の消長は牛血漿のそれと比較して更に一段と僅微である。

(2) 血漿 PAH 濃度を調節してその高低に基く結

Fig. 1. Relation between the percentages of bound PAH and pH in bovine plasma

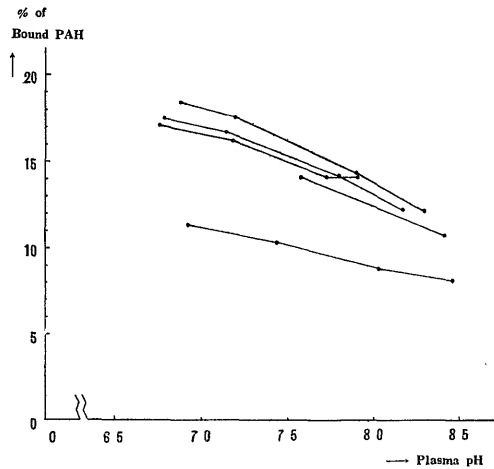
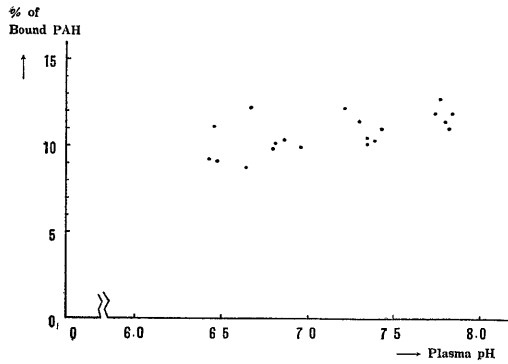


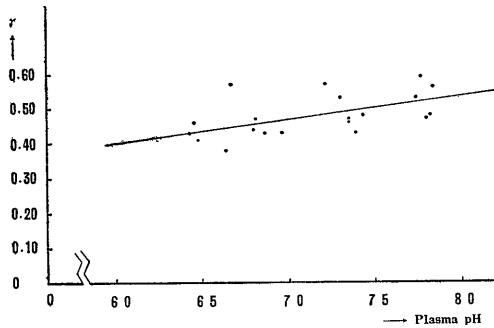
Table 2. Relation between the percentages of bound PAH and pH in bovine plasma

	Concent. of Plasma protein gm/dl	Concent. of PAH in Plasma mg/100gmH <sub>2</sub> O	Concent. of PAH in Ultrafilt. mg/100gmH <sub>2</sub> O	Bound PAH mg/100gmH <sub>2</sub> O	% of Bound PAH %	Plasma pH (Room temp.)	Room temp. °C
1	6.6	32.5	27.9 29.0	4.6 3.5	14.1 10.7	7.58 8.42	12
2	6.9	32.6	27.0 27.3 28.0 28.0	5.6 5.3 4.6 4.6	17.1 16.2 14.1 14.1	6.76 7.18 7.73 7.91	14
3	6.6	31.8	28.2 28.5 29.0 29.2	3.6 3.3 2.8 2.6	11.3 10.3 8.8 8.1	6.92 7.44 8.03 8.46	18
4	8.0	35.9	29.6 29.9 30.8 31.5	6.3 6.0 5.1 4.4	17.5 16.7 14.2 12.2	6.79 7.15 7.80 8.17	20
5	6.7	32.0	26.1 26.4 27.4 28.1	5.9 5.6 4.6 3.9	18.4 17.5 14.3 12.1	6.88 7.20 7.90 8.30	16

Fig. 2. (A) Relation between the percentages of bound PAH and pH in human plasma at 37°C



(B) Relation between  $\gamma$  and pH in human plasma at 37°C



合 PAH の割合の消長を調べると第 3 表及び図 3 のようになる。試料となつた牛血漿 6 例は、その総蛋白濃度において平均 6.7gm/dl で比較的均等な値を有し、いずれも  $\text{CO}_2$  約 5% を含む空気と平衡させて  $\text{pCO}_2$ , pH をなるべく生理的に近く調節し、嫌氣的に遠心限外濾過を行つた。その際の温度は室温であるが、1 例のみ 12°C を除き他の 5 例は 16~18°C でかなり均等な温度条件下に在ると考えられる。

扱て以上の実験条件と照し合せて成績を検討してみると、血漿 PAH 濃度の上昇と共に結合 PAH の絶対量は増加するけれどもその血漿中総量に対する割合は却つて減少する。

即ち血漿 PAH 濃度 20~30mg/100gmH<sub>2</sub>O 附近より低濃度に向つては結合 PAH の割合は相当急速に増大し、逆に高濃度に向うと減少して行くが 60~70mg/100gmH<sub>2</sub>O 附近になると漸減の度合はかなり軽度となつて来る。かかる成績は血漿蛋白と PAH との結合関係が生理的条件下に在つても質量作用の法則に従うことを予想せしめるものである。

(3) 血漿アルブミンと PAH の結合に及ぼす温度の影響について牛血漿による予備実験からそれが意外に大きなものとの見込みが附いたので、人血漿 6 例を用いて更に詳細に吟味を行つた。即ち血漿 PAH 濃度

Table 3. Combination of PAH with protein at various concentrations of PAH in bovine plasma

	Concent. of Plasma protein gm/dl	Concent. of PAH in Plasma mg/100gmH <sub>2</sub> O	Concent. of PAH in Ultrafilt. mg/100gmH <sub>2</sub> O	Bound PAH mg/100gmH <sub>2</sub> O	% of Bound PAH %	Plasma pH (Room temp.)	Room temp. °C
1	6.9	14.2	11.2	3.0	21.1	7.30	16
		35.0	30.0	5.0	14.2		
		69.4	60.6	8.8	12.6		
2	6.2	12.1	9.1	3.0	24.8	7.55	17
		29.7	24.2	5.5	18.5		
		61.0	53.4	7.6	12.4		
3	6.8	7.65	5.77	1.88	24.5	7.44	16
		13.1	10.2	2.9	22.1		
		32.7	27.2	5.5	16.8		
		66.6	57.8	8.8	13.2		
4	6.8	6.26	4.63	1.63	26.0	7.36	18
		11.1	8.67	2.43	21.8		
		27.6	22.6	5.0	18.1		
		54.3	46.8	7.5	13.8		
5	6.9	6.95	5.33	1.62	23.3	7.60	16
		13.3	10.5	2.8	21.0		
		32.6	27.3	5.3	16.2		
		61.1	53.4	7.7	12.6		
6	6.7	6.96	5.11	1.85	26.5	7.32	12
		12.2	9.38	2.82	23.1		
		31.7	26.5	5.2	16.4		
		60.5	52.7	7.8	12.8		

Fig. 3. Combination of PAH with protein at various concentrations of PAH in bovine plasma

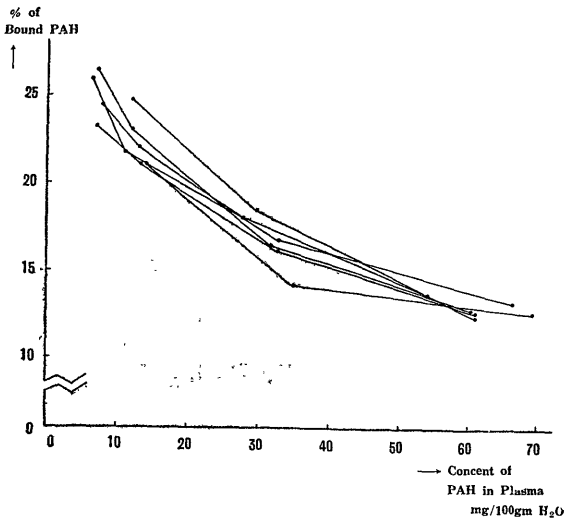
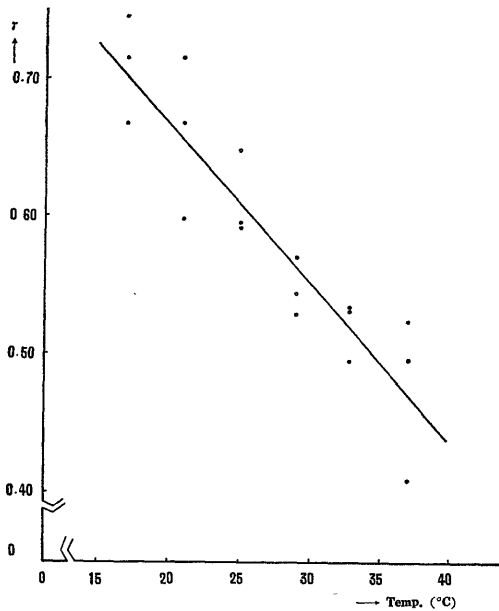


Fig. 4. Effect of temperature on the combination of PAH with plasma protein



を便宜上 40 mg/dl (腎尿細管分泌極量測定の際 30~50mg/dl が用いられる) に固定し、4°C の等温度間隔で嫌氣的遠心限外濾過を行い結合 PAH 量のパラメーターとしては前々節 (1) で用いられたと同じ  $\gamma$  値を探り、実験温度 ( $t^{\circ}\text{C}$ ) に対して  $\gamma$  の値を plot したものが図 4 である。なおこの際  $\gamma$  値と試料 pH に関しては同じく前々節 (1) の  $\frac{\Delta\gamma}{\Delta\text{pH}} = 0.067$  を用いて  $\gamma$  の値を pH 7.40 におけるそれに換算補正した。

図て如上の条件下で少なくとも 17~37°C の範囲では  $\gamma$  と温度 ( $t^{\circ}\text{C}$ ) との間には略々直線関係が成立すると見做すことが出来、最小自乗法によつて回帰方程式を求めると、

$$\gamma = 0.90804 - 0.011860 t \dots\dots\dots (3)$$

を得る。

斯様に温度の影響は著しく大きいから、実験に際しては温度条件の明確な規定とその厳格な保持を不可欠とする。

B. 可及的生理的条件下で行われた人、牛、家兎、犬各血漿による実験

前章 A の成績に鑑みて人、牛、家兎、犬の以上 4 種の各血漿について、温度、pH ( $\text{pCO}_2$ )、蛋白質濃度等を可及的生理的条件下に維持して遠心限外濾過を行い、夫々の血漿における血漿蛋白と PAH の結合現象の特性及び相互の異同を知ると共に更に本現象が予想の如く質量作用の法則に準拠して化学量論的に取扱い得るや否や、若し取扱い得るものならばその適切な方法を明らかにし進んでその生物学的、就中生理学的意義を把握せんとした。

そこで実験データの化学量論的取扱いのために各定値を夫々モル濃度に換算し、I. M. Klotz 等<sup>17)</sup> に倣つて  $\frac{1}{\gamma}$  及び  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  を計算し  $\frac{1}{\gamma}$  を  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  に対して plot した。ここに  $\gamma$  は既に繰返し用いられたものと同一であり、[free PAH] とは遊離の (蛋白と結合しない限外濾過性の) PAH モル濃度を表わす。

そもそも蛋白質と有機イオンの結合に関して Klotz 等の提出した理論式<sup>17)</sup> の中で最も簡単な場合は次の通りである。

$$\frac{1}{\gamma} = \frac{K}{n[A]} + \frac{1}{n} \dots\dots\dots (4)$$

因みに、K: 蛋白質分子 (ここでは血漿アルブミン分子) にある 1 個の結合部位と小分子 A が結合する際の解離恒数、即ち intrinsic dissociation constant と呼ばれるものである。n: 蛋白質 1 分子当り結合し得る A 分子の最大数。

[A]: 蛋白と結合しない (遊離の、限外濾過性の) 有機陰イオン A のモル濃度 (ここでは [freePAH] を指す) を表わす。

(1) 牛血漿 10 例より試料を得てこれらを  $\text{CO}_2$  約 5% を含む空気と平衡させて試料 pH を pH 7.23~7.38 に調節し 37°C で嫌氣的に遠心限外濾過を行つた実験の成績が第 4 表及び第 5 表であり、そのうちで  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  に対応する  $\frac{1}{\gamma}$  の値を plot したものが図 5 である。

今図 5 について、Klotz 等に倣い各点に [freePAH] に比例した“重み”を着けて最小自乗調整を施すと相

関係数 = 0.896 で回帰直線を求めることが出来る。従つてこの直線は前述の Klotz の理論式 ④ に当てはめ得るものと考えられる。

今直線の傾斜と位置とから K, n を求めると,  $K = 406 \times 10^{-5}$ ,  $n = 1.95$  が得られ, これらを ④ 式に代入すると,

$$\frac{1}{\gamma} = \frac{406 \times 10^{-5}}{1.95 [\text{free PAH}]} + \frac{1}{1.95}$$

となる。

この式は牛血漿アルブミンと PAH の生理的条件下

における結合関係の特性を化学量論的に表示するものと考えられる。

(2) 人血漿 10例について pH 7.22~7.38, 37°C 嫌氣的に遠心限外濾過を行つた実験の成績を第 6 表及び第 7 表に示す。

前節の牛血漿の場合に做つて  $\frac{1}{\gamma}$  及び  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  の関係をグラフにすると図 6 のようになる。前節(1)の場合と同じく各点に [free PAH] に比例した“重ミ”を着けて最小自乗調整を施すと相関係数 = 0.960

Table 4. The amount of bound PAH in the bovine plasma observed under physiological conditions

	Concent. of Plasma protein gm/dl	Concent. of Plasma albumin gm/100gmH <sub>2</sub> O	Water Content of Plasma gm/dl	Plasma pH (37°C)	Concent. of PAH in Plasma mg/100gmH <sub>2</sub> O	Concent. of PAH in Ultrafilt. mg/100gmH <sub>2</sub> O	Bound PAH mg/100gmH <sub>2</sub> O
1	5.77	2.80	94.67	7.23	31.27 63.8 121.1 238.3	27.40 56.9 112.4 225.6	3.87 6.9 8.7 12.7
2	5.16	2.52	95.13	7.23	18.56 37.37 57.29 76.0	15.85 33.0 52.7 68.5	2.71 4.37 4.59 7.5
3	5.19	2.37	95.11	7.31	18.69 37.12 57.3 76.96	16.08 33.35 52.7 69.5	2.61 3.77 4.6 7.46
4	4.71	2.85	95.47	7.27	14.91 23.15 33.94 67.4	12.58 20.25 29.85 61.1	2.33 2.90 4.09 6.3
5	5.16	2.78	95.13	7.30	14.51 23.65 35.90 73.8	12.48 20.45 32.15 67.1	2.03 3.20 3.75 6.7
6	6.48	2.37	94.14	7.36	16.55 24.27 36.38 70.9	13.83 20.70 31.70 63.4	2.72 3.57 4.68 7.5
7	5.31	2.60	95.02	7.36	17.36 24.05 35.42 71.7	14.93 20.95 31.25 64.3	2.43 3.10 4.17 7.4
8	4.83	2.88	95.38	7.38	15.39 25.06 29.83 70.4	13.35 22.25 26.35 64.3	2.04 2.81 3.48 6.1
9	6.34	2.99	94.25	7.35	16.07 26.21 38.62 75.75	13.80 23.05 33.35 68.3	2.27 3.16 5.27 7.45
10	6.64	2.85	94.02	7.35	28.88 44.56 86.58 167.2	26.80 39.30 80.0 155.8	2.08 5.26 6.58 11.4

で回帰直線が求められる。従つてこの直線は前節(1)の牛血漿の例よりも更によく④式に当てはめることが出来る。

今 K, n を求めると  $K=760 \times 10^{-5}$ ,  $n=2.55$  が得られるから④式に代入すると

$$\frac{1}{\gamma} = \frac{760 \times 10^{-5}}{2.55 [\text{free PAH}]} + \frac{1}{2.55}$$

となる。

この式は人血漿アルブミンと PAH の生理的条件下における結合関係の特性を化学量論的に表示するもの

と考えられる。

(3) 家兎血漿 7 例について pH 7.45~7.55, 37°C, 嫌氣的に遠心限外濾過を行つて得た実験成績が第 8 表及び第 9 表で、同じく  $\frac{1}{\gamma}$  と  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  に関するグラフが図 7 である。前例に倣つて回帰直線が求められ相関係数は 0.869 である。

よつてこの直線も亦同様に④式に当てはめることが出来る, K, n を求めると  $K=777 \times 10^{-5}$ ,  $n=3.33$  を得るから④式に代入すると

Table 5. Estimation of  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  from the data shown in Table 4.

	Concent. of Plasma albumin $\times 10^{-4} \text{Mol/kgH}_2\text{O}$	Concent. of PAH in Ultrafilt. $\times 10^{-5} \text{Mol/kgH}_2\text{O}$	Bound PAH $\times 10^{-5} \text{Mol/kgH}_2\text{O}$	$\frac{1}{\gamma}$	$\frac{1}{[\text{free PAH}]}$ $\times 10^3$
1	4.00	141	19.9	2.01	0.71
		293	35.6	1.12	0.34
		579	44.8	0.89	0.17
		1163	65.5	0.61	0.086
2	3.60	81.7	14.0	2.57	1.22
		170	22.5	1.60	0.59
		272	23.6	1.53	0.37
		353	38.6	0.93	0.28
3	3.39	82.8	13.4	2.53	1.21
		172	19.4	1.75	0.58
		272	23.7	1.43	0.37
		358	38.4	0.88	0.28
4	4.07	64.8	12.0	3.39	1.54
		104	14.9	2.73	0.96
		154	21.1	1.93	0.65
		315	32.5	1.25	0.32
5	3.97	64.3	10.5	3.78	1.56
		105	16.5	2.41	0.95
		166	19.3	2.06	0.60
		346	34.5	1.15	0.29
6	3.39	71.3	14.0	2.42	1.40
		107	18.4	1.84	0.93
		163	24.1	1.41	0.61
		327	38.6	0.88	0.31
7	3.71	76.9	12.5	2.97	1.31
		108	16.0	2.32	0.93
		161	21.5	1.73	0.62
		331	38.1	0.97	0.30
8	4.11	68.8	10.5	3.91	1.45
		115	14.5	2.84	0.87
		136	17.9	2.30	0.74
		331	31.4	1.31	0.30
9	4.27	71.1	11.7	3.65	1.41
		119	16.3	2.62	0.84
		172	27.2	1.57	0.58
		352	38.4	1.11	0.284
10	4.07	138	10.7	3.80	0.724
		202	27.1	1.50	0.495
		412	33.9	1.20	0.243
		803	58.7	0.69	0.125



$$\frac{1}{\gamma} = \frac{777 \times 10^{-5}}{3.33 [\text{free PAH}]} + \frac{1}{3.33}$$

となる。

本式は家兎血漿アルブミンと PAH の生理的条件下における結合関係の特性を化学量論的に表示するものと考えられる。

(4) 犬血漿 4 例について pH 7.31~7.41, 37°C, 嫌氣的に遠心限外濾過を行つた実験の成績が第10表である。しかしながらこの実験においては (1) (2) (3)

の場合に就つて  $\frac{1}{\gamma}$  及び  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  を算出したが、

グラフにしてみると 図 8 の如く成績は大きく分散した。従つて  $\frac{1}{\gamma}$  と  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  の間に明確な函数関係は認め難く、Klotz 等の理論式④を犬血漿の場合に適する訳にはいかならなかつた。

附. 遠心限外濾過法における温度と濾液量との関係について

和紙コロヂオン膜を濾膜として使用する際に、実験

Table 6. The amount of bound PAH in the human plasma observed under physiological conditions

	Concent. of Plasma protein gm/dl	Concent. of Plasma albumin gm/100gmH <sub>2</sub> O	Water content of Plasma gm/dl	Plasma pH (37°C)	Concent. of PAH in Plasma mg/100gmH <sub>2</sub> O	Concent. of PAH in Ultrafilt. mg/100gmH <sub>2</sub> O	Bound PAH mg/100gmH <sub>2</sub> O
1	4.23	3.03	95.83	7.30	16.88 32.04 65.53 117.0	14.63 28.20 58.0 106.2	2.25 3.84 7.53 10.8
2	4.85	3.46	95.36	7.32	21.50 31.93 61.9 94.9	18.25 27.75 55.0 84.9	3.25 4.18 6.9 10.0
3	4.55	3.08	95.59	7.27	17.76 24.17 32.33 56.70	15.70 21.60 29.00 50.90	2.06 2.57 3.33 5.80
4	4.71	3.06	95.47	7.35	16.55 34.83 47.76 80.1	14.40 29.50 42.90 75.4	2.15 5.33 4.86 4.7
5	5.54	3.43	94.85	7.30	16.29 24.35 48.08 77.49	13.98 21.10 42.10 68.8	2.31 3.25 5.98 8.69
6	5.19	3.27	95.11	7.22	17.12 25.18 47.31 80.4	15.23 22.30 41.75 72.3	1.89 2.88 5.56 8.1
7	5.43	3.13	94.93	7.23	21.86 32.08 — 70.6	19.25 28.15 — 62.8	2.61 3.93 — 7.8
8	6.52	3.81	94.11	7.38	16.93 24.55 32.83 43.57	14.75 21.45 28.55 38.60	2.18 3.10 4.28 4.97
9	5.68	3.30	94.74	7.32	18.37 25.29 32.88 39.90	16.18 22.40 29.50 35.70	2.19 2.89 3.38 4.20
10	5.24	3.39	95.07	7.24	17.99 26.03 — 39.87	15.08 23.10 — 35.45	2.19 2.93 — 4.42

温度の相違によつてかなり著しい濾液量の差が生ずることに気づいたので、犬血漿及び 0.005gm/dl コンゴロート水溶液を夫々試料としてこの点を吟味した。

試料量はすべて 10ml とし、濾膜としては和紙コロデオ標準濾膜を用い、操作は非嫌氣的とし、遠心条件は 2500 R.P.M.×10分 (犬血漿), 2500 R.P.M.×5分 (コンゴロート水溶液) で、実験温度は 13°C, 21°C, 29°C, 37°C の 4 段階に調節し、各温度における濾液量を測定した。

その成績は第11表に示す通りであつて、実験温度が 13°C から 37°C に上昇すると濾液量は 2 倍乃至それ以上にも増加するが、この原因は濾膜の濾過能率が実験温度の上昇と共に向上することに在ると考えられる。

III 考 按

蛋白質と種々の小分子イオンが結合する場合にこれを理論的に考究するためには Goldstein<sup>7)</sup> が述べて

Table 7. Estimation of  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  from the data shown in Table 6

	Concent. of Plasma albumin × 10 <sup>-4</sup> Mol/kgH <sub>2</sub> O	Concent. of PAH in Ultrafilt. × 10 <sup>-5</sup> Mol/kgH <sub>2</sub> O	Bound PAH × 10 <sup>-5</sup> Mol/kgH <sub>2</sub> O	$\frac{1}{\gamma}$	$\frac{1}{[\text{free PAH}]}$ × 10 <sup>3</sup>
1	4.33	75.4	11.6	3.73	1.33
		145	19.8	2.19	0.69
		299	38.8	1.12	0.334
		547	55.6	0.78	0.183
2	4.94	94.0	16.7	2.96	1.06
		143	21.5	2.30	0.699
		283	35.5	1.39	0.353
		437	51.5	0.96	0.229
3	4.40	80.9	10.6	4.15	1.24
		111	13.2	3.33	0.901
		149	17.2	2.56	0.671
		262	29.9	1.47	0.382
4	4.37	74.2	11.1	3.94	1.35
		152	27.5	1.59	0.658
		221	25.0	1.75	0.452
		388	24.2	1.81	0.258
5	4.90	72.0	11.9	4.12	1.39
		109	16.7	2.93	0.917
		217	30.8	1.59	0.461
		354	44.8	1.09	0.223
6	4.67	78.5	9.7	4.81	1.27
		115	14.8	3.16	0.869
		244	28.6	1.63	0.409
		372	41.7	1.12	0.269
7	4.47	99.2	13.4	3.34	1.01
		145	20.2	2.21	0.690
		—	—	—	—
		324	40.2	1.11	0.309
8	5.44	76.0	11.2	4.86	1.32
		111	16.0	3.41	0.901
		147	22.1	2.46	0.680
		199	25.6	2.16	0.502
9	4.71	83.4	11.3	4.17	1.20
		115	14.9	3.16	0.870
		152	17.4	2.71	0.658
		184	21.6	2.18	0.543
10	4.84	81.4	11.3	4.28	1.23
		119	15.1	3.21	0.840
		—	—	—	—
		183	22.8	2.12	0.546

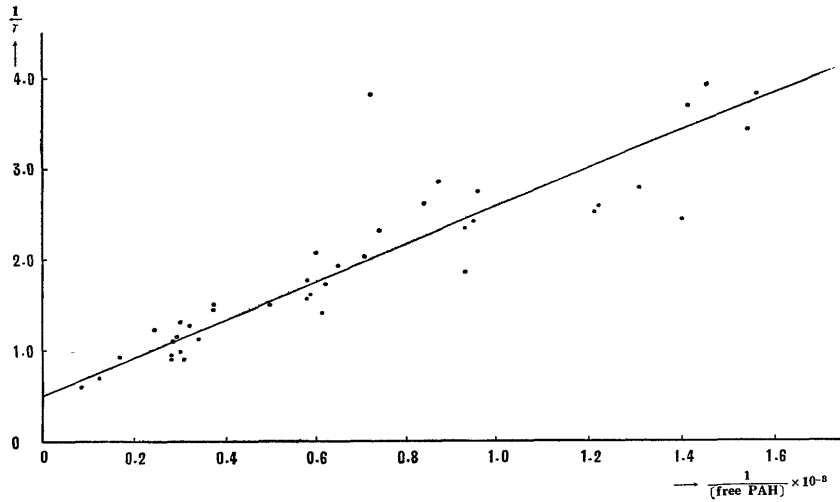
Fig. 5. Relation between  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  of bovine plasma

Table 8. The amount of bound PAH in the rabbit plasma observed under physiological conditions

	Concent. of Plasma protein gm/dl	Concent. of Plasma albumin gm/100gmH <sub>2</sub> O	Water content of Plasma gm/dl	Plasma pH (37°C)	Concent. of PAH in Plasma mg/100gmH <sub>2</sub> O	Concent. of PAH in Ultrafilt. mg/100gmH <sub>2</sub> O	Bound PAH mg/100gmH <sub>2</sub> O
1	4.94	3.05	95.30	7.49	25.24 34.16 65.37 118.4	22.05 29.75 57.5 93.8	3.19 4.41 7.87 24.6
2	3.53	2.11	96.35	7.52	— 40.84 63.31 —	— 36.75 57.00 —	— 4.09 6.31 —
3	4.53	2.08	95.60	7.45	33.32 48.69 82.53 115.1	29.50 43.50 74.7 106.5	3.82 5.19 7.83 8.6
4	4.59	2.08	95.56	7.47	32.86 48.72 80.05 111.4	29.65 43.25 73.0 101.8	3.21 5.47 7.05 9.6
5	3.80	2.48	96.15	7.55	32.14 39.31 64.53 240.5	29.00 35.70 59.30 231.2	3.14 3.61 5.23 9.3
6	4.00	2.60	96.00	7.54	32.45 40.10 58.02 232.1	27.35 35.70 54.55 219.0	5.10 4.40 3.47 13.1
7	3.64	2.34	96.27	7.45	24.98 32.10 41.60 75.1	21.85 29.25 37.35 68.4	3.13 2.85 4.25 6.7

Fig. 6. Relation between  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  of human plasma

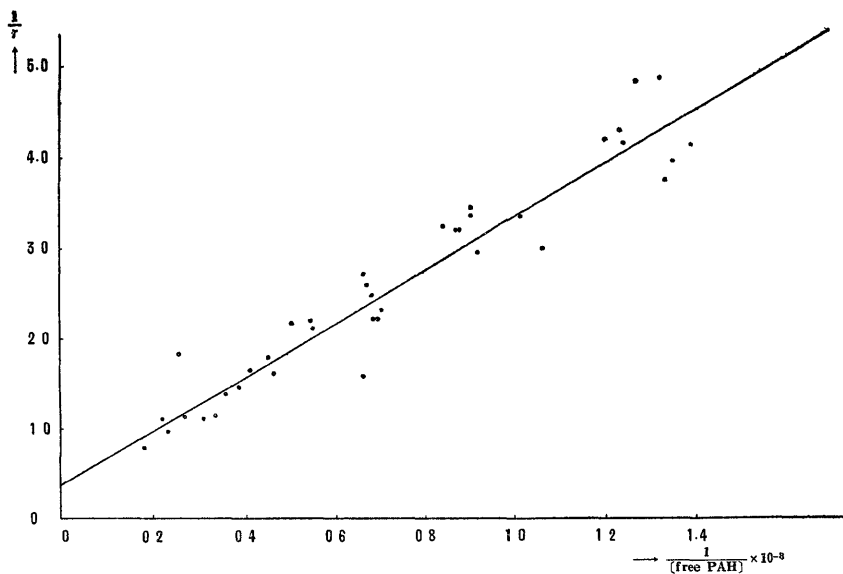


Table 9. Estimation of  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  from the data shown in Table 8

	Concent. of Plasma albumin $\times 10^{-4} \text{Mol/kgH}_2\text{O}$	Concent. of PAH in Ultrafilt. $\times 10^{-5} \text{Mol/kgH}_2\text{O}$	Bound PAH $\times 10^{-5} \text{Mol/kgH}_2\text{O}$	$\frac{1}{\gamma}$	$\frac{1}{[\text{free PAH}]}$ $\times 10^8$
1	4.36	114 153 296 483	16.4 22.7 40.5 127	2.66 1.92 1.08 0.34	0.880 0.652 0.338 0.207
2	3.01	— 189 294 —	— 21.1 32.5 —	— 1.43 0.93 —	— 0.528 0.341 —
3	2.97	152 224 385 549	19.7 26.7 40.3 44.3	1.51 1.11 0.737 0.670	0.658 0.446 0.260 0.182
4	2.97	153 223 376 524	16.5 28.2 36.3 49.5	1.80 1.05 0.82 0.60	0.655 0.449 0.266 0.191
5	3.54	149 184 306 1191	16.2 18.6 26.9 47.9	2.19 1.90 1.32 0.74	0.669 0.544 0.327 0.084
6	3.71	141 184 281 1128	26.3 22.7 17.9 67.5	1.41 1.63 2.07 0.55	0.710 0.544 0.356 0.0886
7	3.34	113 151 192 352	16.1 14.7 21.9 34.5	2.07 2.27 1.53 0.97	0.888 0.664 0.520 0.284

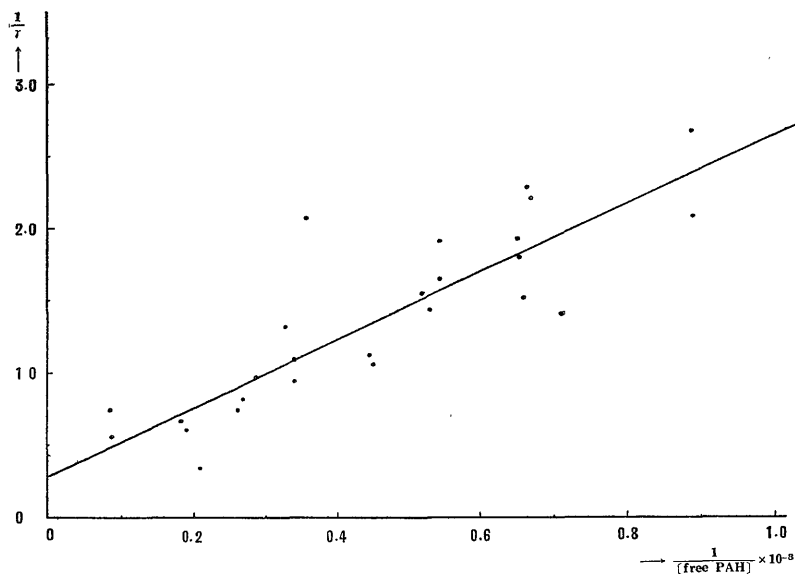
Fig. 7. Relation between  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  of rabbit plasma

Table 10. (A) The amount of bound PAH in the canine plasma observed under physiological conditions

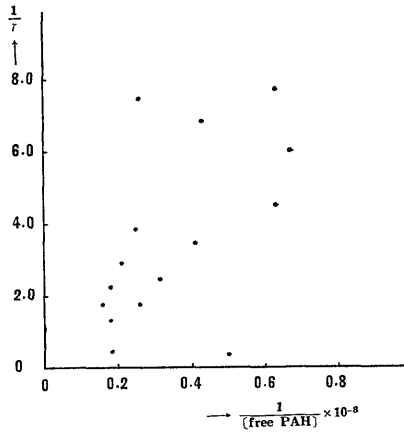
	Concent. of Plasma protein gm/dl	Concent. of Plasma albumin gm/100gmH <sub>2</sub> O	Water content of Plasma gm/dl	Plasma pH (37°C)	Concent. of PAH in Plasma mg/100gmH <sub>2</sub> O	Concent. of PAH in Ultrafilt. mg/100gmH <sub>2</sub> O	Bound PAH mg/100gmH <sub>2</sub> O
1	4.90	2.83	95.33	7.37	29.95	31.25	-1.30
					64.57	39.00	25.57
					80.03	78.0	2.03
					121.3	104.6	16.7
2	5.08	2.53	95.19	7.31	32.46	30.90	1.56
					49.27	47.25	2.02
					79.63	75.6	4.03
					113.4	107.9	5.5
3	4.17	2.71	95.87	7.33	30.25	29.00	1.25
					46.10	45.00	1.10
					75.41	74.4	1.01
					109.1	105.8	3.3
4	4.81	2.08	95.39	7.41	31.45	30.70	0.75
					63.95	61.60	2.35
					93.20	91.2	2.00
					123.2	119.9	3.3

(B) Estimation of  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  from the data shown in Table 10 (A)

	Concent. of Plasma albumin $\times 10^{-4}$ Mol/kgH <sub>2</sub> O	Concent. of PAH in Ultrafilt. $\times 10^{-5}$ Mol/kgH <sub>2</sub> O	Bound PAH $\times 10^{-5}$ Mol/kgH <sub>2</sub> O	$\frac{1}{\gamma}$	$\frac{1}{[\text{free PAH}]}$ $\times 10^3$
1	4.04	161	-6.7	-6.03	0.621
		201	132	0.306	0.498
		402	10.5	3.85	0.249
		539	86	0.470	0.186

2	3.61	159	8.04	4.49	0.628
		243	10.4	3.47	0.411
		389	20.8	1.74	0.257
		556	28.3	1.28	0.180
3	3.87	149	6.44	6.01	0.669
		232	5.67	6.83	0.431
		383	5.20	7.44	0.261
		545	17.1	2.26	0.183
4	2.97	158	3.86	7.69	0.632
		317	12.1	2.45	0.315
		470	10.3	2.88	0.213
		618	17.0	1.75	0.162

Fig. 8. Relation between  $\frac{1}{\gamma}$  and  $\frac{1}{[\text{free PAH}]}$  of canine plasma



いるように化学量論的に取扱わねばならないが、この問題に先鞭をつけたものが I. M. Klotz 等<sup>17)</sup>の研究である。即ち彼等は小分子有機陰イオンとしてアゾ色素を用い、セロファン膜透析法によつて牛血清アルブミンとの結合関係を調べ、この実験的裏付けの下に質量作用の法則に基く理論式を提出したが、その最も簡単な場合として若し小分子 A が蛋白質分子の表面に比較的散在する同種の基と結合し、しかも先に結合した A 分子が次の A 分子の結合に対して静電的反撥を示さぬ時は、前章で著者が既に自らの実験成績の理論的取扱いのために応用したところの  $\frac{1}{\gamma} = \frac{K}{n[A]} + \frac{1}{n}$  ……④ という大変簡潔な形の理論式が成立することを示した。従つて上述の仮定に該当する場合には、実験的に求めた  $\frac{1}{\gamma}$  と  $\frac{1}{[A]}$  との間に直線関係が成立しこの直線の位置と傾斜とから K, n を定め得る訳である。

又て Klotz 等によつて発展させられた透析平衡法は血漿蛋白質と他の小分子物質の結合を調べるために

Table 11. Effect of temperature on the amounts of ultrafiltrate in the centrifugal ultrafiltration

A) Canine plasma (Totalprotein : 4.5 gm/dl)

温度 (°C)		13	21	29	37
濾液量 (ml)	1	0.22	0.23	0.30	0.40
	2	0.23	0.25	0.30	0.39
平均濾液量 (ml)		0.23	0.24	0.30	0.40

B) Congored solution (0.005 gm/dl)

温度 (°C)		13	21	29	37
濾液量 (ml)	1	0.58	0.75	1.30	1.20
	2	0.55	0.65	0.67	1.25
平均濾液量 (ml)		0.57	0.70	0.99	1.23

最も一般的な方法とされているが、これを実施するには一般に試料（血漿、血清又は血清蛋白結晶等）を緩衝液で大幅に稀釈し（Klotz が最初用いた試料は牛血清アルブミン結晶を0.1%の濃度に緩衝液に溶解したものであった）、且つ非常な長時間（通常2〜3昼夜）を必要とする。従つてわけても血漿或いは血清等生体から採取された材料を直接実験試料に供する場合には、体温下の実験を行うことも容易ではない上に、そもそもその蛋白質濃度を始めとして諸成分濃度、溶存ガス分圧等は全く生理的条件からかけ離れているのが普通である。

又島尾<sup>18)</sup>、楠<sup>19)</sup>等の行つた分光光度計を用いて透析を行わず分光吸光曲線によるメタクロマジメ測定を行う方法も、その用途は蛋白結合の相手に色素を使用するという場合に限られており、蛋白との結合を色素と競合しその競合の度合は分光吸光曲線による色素のメタクロマジメ測定から知り得るというような特殊の例外を除いては色素以外の物質を用いる場合に応用出来ない。

その他各種の方法<sup>20)</sup>について見ても既に度々繰返しているように可及的生理的条件下で10分間前後の極短時間内というような注文を付けられてもなお且つ用に耐える程の方法は極めて稀である。

これらと比較する時、著者が応用した遠心限外濾過法は誠に合目的々な方法であるといえよう。即ちイ) Anticoagulant 及び僅少の PAH ソーダ溶液の添加以外に血漿の稀釈は行われぬ。従つて血漿中の諸成分濃度が生理的範囲外に遠く逸脱することがない。ロ) 嫌氣的操作が行われるために溶存ガス分圧の著しい低下、殊に CO<sub>2</sub> 脱出に伴う pH の変動が防止される。ハ) 極めて短時間（10分間前後）内に限外濾過が完了する。ニ) 限外濾過温度は体温を含めてかなり任意に調節出来る。ホ) 微量定量法と組合せて相当精密な定量実験が可能である。

又従来限外濾過法は濾過の進行中に絶えず試料蛋白質濃度が変化して行くこと、及び濾膜表面に蛋白質が蓄積されるという理由から透析平衡法と比較して精密な定量的研究の手段としてはより劣るともいわれているようであるが、著者の応用した遠心限外濾過法に在つては、和紙コロジオン膜（標準濾膜）の卓越した濾過性能と微量定量法との組合せによつて、濾過前後の試料蛋白濃度差を僅々数%以内に留めると同時に濾膜表面の蛋白蓄積もかなり軽減されていから前述の諸長所と併せて考慮すると、可及的生理的条件下における定量実験の手段としては寧ろ遙かに優れているといえよう。

著者は前々章 II A に示された通り、血漿アルブミンと PAH の結合に及ぼす pH、血漿 PAH 濃度、及び温度の影響を検討して本現象の定量的な outline を知り、次いで前章 II B のように人、牛、家兎、犬から試料を得て可及的生理的条件下における結合現象を主として化学量論的見地から更に精細に追究し、これら人及び他の3種の動物の中で犬を除く人、牛、家兎の各血漿アルブミンと PAH との結合現象は、生理的条件下においても質量作用の法則に準拠して化学量論的に取扱われるべきものであり、しかも都合の好いことには Klotz 等の提出した理論式の中でも最も簡単な場合であるところの  $\frac{1}{\gamma} = \frac{K}{n[A]} + \frac{1}{n}$  ……④によつて容易にしかも理論的に厳密に処理し得ることを実証した。

では如上の事柄は生理学的に如何なる意義を持つであろうか。

そもそも PAH は大体 3〜4mg/dl 以内の血漿中濃度では腎臓に運ばれて糸球体で限外濾過され、その残りは次いで尿細管から殆んどすべて排泄される。従つてこの場合の PAH のクリアランスを求めれば即ち有効腎血漿流量を得るが、更に血漿 PAH 濃度が 5mg/dl を超えるようになると尿細管からの分泌は不完全となり血漿 PAH 濃度の上昇と共に分泌量は増すけれども最後には一定値に達して固定してしまう。

この最大分泌量を求めるのが尿細管分泌極量の測定であつて、この際血漿 PAH 濃度は 30〜50mg/dl が適当とされ、現在腎分泌機能検査法の中でも最も大切なものの一つである。

而して尿細管分泌極量 (T<sub>m</sub>) の計算は次式によつて行われる。

$$T_m = U_{PAH}V - P_{PAH} \cdot FW \cdot C_F \dots\dots\dots ⑤$$

但し U<sub>PAH</sub>: 尿中 PAH 濃度

V: 分時尿量

P<sub>PAH</sub>: 血漿 PAH 濃度

C<sub>F</sub>: 糸球体濾過量 (G.F.R.)

F: P<sub>fPAH</sub>/P<sub>PAH</sub> (P<sub>fPAH</sub>: 限外濾液 PAH 濃度)

W: 血漿水分量 (P<sub>PAH</sub>/P<sub>wPAH</sub>)

(∵ P<sub>wPAH</sub> = P<sub>PAH</sub>/W)<sup>1)</sup>

ところでこの FW 値を求める理由は、血漿中の PAH の一部がアルブミンと結合して糸球体で限外濾過されないところから、その補正を行う必要があるためであることは今更いう迄もないことであつて、普通実験的に求められた平均値を一つの常数と見做して間に合せている。

先ず Smith and Smith<sup>2)</sup> はコロジオン嚢を使用

し、*in vitro* における犬及び人の血漿の限外濾過性 PAH 量を測定し、それからこの FW 値を導出すべく試みたが再現性ある成績が得られなかつた。

そこで Smith and Finkelstein<sup>29)</sup> 等は *in vivo* で血漿 PAH 濃度を透過させる (100mg/dl→25mg/dl) 途中において  $U_{PAH}V$  を  $C_{FPAH}$  に対して plot し、最小自乗調整によつて得られた回帰直線の傾斜から直接に FW 値を求め、人血漿について  $FW=0.83$  という値を報告しているが、化学量論的取扱いは見られず、又 Smith<sup>29)</sup> もこういう方法では未だ重大なる誤差が介入する余地のあることを認めている。

次いで Taggart は Visking セロファンチューブを用いた透析実験から FW 値を算出し、人血漿において血漿アルブミン濃度 5.0gm/dl,  $P_{PAH}$  30~50mg/dl の場合、 $FW=0.78\sim0.79$  ( $W=0.90$ ) を得たというが<sup>29)</sup>、詳細な実験条件及び理論的な取扱いについては不明である。

翻つて著者は既に人、牛、家兎の各血漿について、PAH の血漿蛋白結合の現象が生理的条件下において④式に従う所以を明らかにした。而して又、⑤式における各項の定義に従えば

$$FW = \frac{P_{fPAH}/P_{PAH} \cdot P_{PAH}/P_{WPAH}}{[free PAH]} = \frac{P_{fPAH}/P_{WPAH}}{[P_{WPAH}]} \dots\dots\dots ⑥$$

である。従つて或る血漿 (人、牛又は家兎) の総蛋白濃度、血漿アルブミン濃度及び血漿 PAH 濃度 ( $P_{PAH}$ ) の3つが与えられると、イ) 先ず総蛋白濃度から④式に従つて  $W$  を知り、ロ) 血漿アルブミン濃度及び  $P_{PAH}$  を単位水分量当りのモル濃度に換算する。ハ) これらの数値及び然るべき  $K$ 、及び  $n$  の値を④式に代入し [free PAH] を未知数としてこれを算出すれば、ニ) ⑥式より FW 値は容易に求められる。

今人血漿を例にとり、標準的な場合として総蛋白濃度 7 gm/dl、血漿アルブミン濃度 4.4 gm/dl と仮定し、 $P_{PAH}$  を 20, 30, 40, 50, 60 各 mg/dl とした場合の FW 値を理論的に計算して見ると、FW 値は夫々、0.832, 0.840, 0.847, 0.853, 0.859 ( $P_{PAH}$  と同順) を得る。

これは Smith and Finkelstein 等<sup>29)</sup> の求めた  $FW=0.83$  と略々一致するが、計算の根拠は全く相違し、著者の方法は質量作用の法則に準拠した化学量論的基礎の上に立つたものであつて、血漿総蛋白濃度、血漿アルブミン濃度、及び血漿 PAH 濃度 ( $P_{PAH}$ ) の値の変動に応じて常に適用可能である。

但てここにおいて腎機能検査の際に血漿 PAH 濃度が結合 PAH の割合に及ぼす影響について化学量論的立場から振返つて見るのは望ましいことである。

II A (2) において述べられた牛血漿を使用する実験の成績を再検すると次のことに気づくであろう。即ち腎機能検査の際に常用されている血漿 PAH 濃度は有効腎血漿流量測定の場合には 3~4mg/dl、尿管分泌極量測定に際しては 30~50mg/dl であることは既述の通りであるが、実はこれらの常用至適濃度こそ又明らかに結合 PAH の割合が最も左右され易いような濃度領域の一部をなしている。

従つてこの成績からのみ推量するならば、PAH を使用して腎機能検査を行う際には血漿 PAH 濃度に余程注意せぬ限り軽視し得ぬ誤差が介入し得るのではないかという懸念もあながち否定出来ない。

しかしながらこの問題も亦④式を適用することによつて化学量論的に解決出来るのである。

Fig. 9. Effect of  $P_{PAH}$  on the percentage of bound PAH, derived theoretically from the equation ④

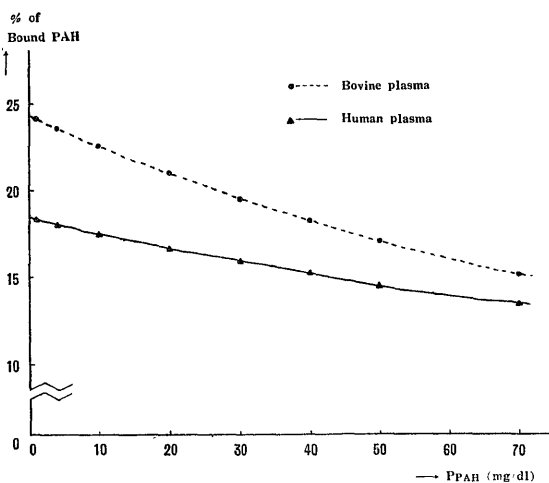


図9は便宜上総蛋白濃度 7gm/dl、アルブミン濃度 4.4 gm/dl の人並びに牛の血漿を仮定し、生理的条件 (体温 37°C, pH 7.30 附近と仮定) で問題の血漿 PAH 濃度領域における結合 PAH の割合の消長を④式によつて理論的に算出した結果であつて、計算方法は先に述べた FW 値算出の場合に準ずる。

直ちに分ることは、II A (2) の図3に比較すると全領域に亘つて結合 PAH の割合が遙かに安定しており、これを腎機能検査に必要な常用至適濃度範囲の夫々即ち 3~4 mg/dl 又は 30~50mg/dl 附近に限つて見るときは、實際上略々一定と見做しても差支えない程である。

このことは人血漿の場合には特によく当てはまるのであつて当初の懸念はこれで解消した訳である。



又図3と図9の間に認められる著しい相違の原因は、血漿アルブミンと PAH の結合に及ぼす温度の影響にこそ求むべきであろう。

即ち II A (3) の実験成績はこの温度の影響というものが著しく大きいことを物語っており、又④式は体温より 10°C~20°C 低い温度でも勿論成立すると考えられるから、かかる比較的低い温度における実験の成績と体温下におけるそれとを較べた場合、夫々の解離恒数 K の値の間に大差が考えられることは蓋し当然であろう。

扱て一般に血漿アルブミンと陰イオンの結合に対する温度の影響については Klotz の綜説<sup>6)</sup> の中でも述べられているように、多くの研究がこれを僅微なものと見做しているようであるが、著者の実験結果によれば、こと血漿アルブミンと PAH の結合に関する限り、斯様な見解は簡単に受入れる訳にはいかぬようである。

唯一般に血漿蛋白と他の小分子物質の結合に関する実験の条件は概して生理的条件から遙かにかけ離れたものが多いように見受けられる。従つて独り温度の影響の問題に限らず、違つた実験成績を比較する場合には先ず夫々の実験条件に充分注意すべきであろう。

血漿アルブミンと PAH の結合に及ぼす pH の影響については II A (1) の成績から明らかなように、一般に軽微であり殊に血漿 pH の生理的範囲に限つて見るときは、pH の差に基く結合 PAH 量の変動は實際上これを考慮の外に置きうる程度である。しかも人血漿の場合においては  $\frac{\Delta Y}{\Delta \text{pH}} = 0.067$  というような補正係数も求められたのであるから、特に精密な実験条件を要求せられるような場合にも充分これに依り得る筈である。

唯少しく立入つて見た場合、牛血漿の場合と人血漿のそれとでは僅かながらその態度に相違が認められるようである。即ち両者は相互に結合 PAH 量と pH の間の相関が逆であつて、このことは動物の種の相違に基く血漿蛋白の微妙な個性差の一端を示すものかも知れない。

以上著者は牛、人、家兎の各血漿について血漿アルブミンと PAH の結合現象を主として生理学的意義を中心として解明したが、特に生理的条件下においてなお且つ Klotz 等の提出した理論式の中で最も簡単な場合であるところの④式が成立する所以を確認し得たことは、“分子論的な考え方を生物学的変化に導入する”ために多少なりとも寄与し得るものと思われる。

又これらの血漿蛋白質並びに PAH の分子構造を顧みると、如上の事がらは独り両者の結合現象の場合

にとどまらず広く血漿蛋白と他の小分子イオンとの生理的条件下における結合関係についても恐らくかなりの類例を予想させるものである。

最後に、著者が実験の試料を得た牛、人、家兎、犬の中で犬血漿のみは前3者の場合と相違して質量作用の法則に準拠した化学量論的取扱いを適用し難い結果となつた。

従つて少なくとも生理的条件下においては、その FW 値を理論的に導き出すことは出来ない。

#### IV 要 約

(1) 当教室の遠心限外濾過法によつて腎糸球体における生理的限外濾過の過程を *in vitro* において著しく近似的に再現することが出来た。

(2) 本法を応用して人、牛、家兎の各血漿について生理的条件下における血漿アルブミンと PAH の結合関係には Klotz 等の提出した理論式の中で最も簡単な場合であるところの④式が適用し得ることを実証した。

(3) 従つて腎尿細管分泌極量の計算に必要な FW 値は④式から理論的に厳密に算出することが出来、しかも人の場合、かくして算出せられた値は Smith<sup>7)</sup> の求めた値と略々一致する。

(4) 人及び牛の各血漿を使用して調べたところでは、血漿アルブミンと PAH の結合に及ぼす温度の影響は意外にも著しく大きい。

この点に関する限り血漿アルブミンと陰イオンの結合に関する一般の見解とは相容れないように思われる。

(5) 犬血漿については血漿アルブミンと PAH の結合関係に対して少なくとも生理的条件下では化学量論的取扱いを適用することは困難であり、従つてこの場合 FW 値を理論的に算出することは出来ない。

紙筆に当り、終始御指導並びに御快問を賜つた恩師斎藤幸一郎教授に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) Smith, H. W. : The Kidney, Oxford University Press, New York, 1951.
- 2) Smith, W. W. & Smith, H. W. : J. Biol. Chem., 124, 107 (1938).
- 3) Smith, H. W., Finkelstein, N., Aliminoso L., Crawford, B. & Graber, M. : J. Clin. Invest., 24, 388 (1945).
- 4) Chasis, H., Redish, J., Goldring W., Ranges, H. A. & Smith, H. W. : J. Clin. Invest., 24, 583 (1945).
- 5) 宇井信生 : 蛋白質化学,

- 2 卷, 321 頁, 共立出版, 1954.      6) Klotz, I. M. : 蛋白質化学, 4 卷, 15 頁, 共立出版, 1956.      7) Goldstein, A. : J. Pharm. Exper. Therap., 95, 102 (1949).      8) 菓子井幸則 : 日本生理誌, 20, 318 (1958).      9) 齋藤幸一郎・蓮村茂子 : 日新医学, 46, 698 (1959).      10) 菓子井幸則 : 日本生理誌, 20, 325 (1958).      11) Kalant, N. & McArthur, C. S. : J. Lab. & Clin. Med., 35, 836 (1950).      12) Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M. : J. Biol. Chem., 177, 751 (1949).      13) 齋藤正行 : 光電比色計による臨床化学検査, 第 5 版, 南江堂, 1954.      14) McLean, F. C. & Hastings, A. B. : J. Biol. Chem., 108, 285 (1935).      15) 須藤憲三 : 医化学の微量測定法, 第一版, 瓜生済生館, 1931.      16) 齋藤幸一郎・本田良行 : 日新医学, 42, 167 (1955).      17) Klotz, I. M., Walker, F. M. & Pivan, R. B. : J. Am. Chem. Soc., 68, 1486 (1946).      18) Shimao, K. : J. Biochem., 39, 239 (1952).      19) Kusunoki, T. : J. Biochem., 39, 245 (1952).

## Abstract

Studies were made in vitro on the combination of para amino hippuric acid (PAH) with albumin in plasma by using the centrifugal ultrafiltration method devised in our laboratory. As experimental materials, human, bovine, rabbit and canine plasma were used. The results were as follows:

1. Effect of pH on the combination of PAH with albumin was found to be negligibly small, so that it is unnecessary to pay a close attention to the pH-control in medical practice.

2. Temperature proved to have a marked effect on the combination of PAH with albumin. The amount of PAH combined was lineally in inverse proportion to temperature within the range of 17 to 37°C.

3. The pattern of the combination of PAH with albumin under physiological conditions with regard to pCO<sub>2</sub>, pH and temperature was found to be expressed by the Klotz equation,

$$\frac{1}{r} = \frac{K}{n(A)} + \frac{1}{n},$$

where K is the dissociation constant of PAH-albumin, r is the number of PAH molecules combined with each molecule of albumin, n is the maximum combining capacity of albumin and (A) is the concentration of free PAH in plasma. The values of K and n estimated from our data are as follows: 760 × 10<sup>-5</sup>, 2.55 for human plasma, 406 × 10<sup>-5</sup>, 1.95 for bovine plasma, and 777 × 10<sup>-5</sup>, 3.33 for rabbit plasma respectively. For canine plasma, the data were not so reproducible as to permit theoretical consideration.

4. From the data on human plasma, estimation was made of the percentage of free PAH in plasma on the assumption that the contents of protein and albumin of plasma were respectively 7 and 4.4 gm/dl. The percentage of free PAH varies slightly in proportion to the varying concentrations of PAH and amounts to 84% for 30 mg/dl PAH, which agree well with the value obtained by Smith with in vivo experiments.