

遠心限外濾過法による血色素と CO₂ との結合の研究

金沢大学医学部第一生理学教室(主任 齋藤教授)

養 口 真

(昭和35年2月20日受付)

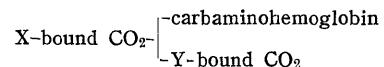
1905年, C. Bohr¹⁾は CO₂ と血色素(以下 Hb と略記する)が直接結合することを見出し“Carbhaemoglobin”と命名して以来, 血液中に HCO₃⁻以外の形で存在する結合炭塩, 殊にカルバメイトの形で Hb と結合している CO₂ に関して多くの研究²⁾が種々の方法を用いてなされてきた。

HCO₃⁻以外の形の結合炭酸については, Hb と結合した CO₂ が, HCO₃⁻に見られるような電気的影響力を失い, 或いは滲透圧等に関与しなくなるであろうとの考えから, Hb 溶液とその透析液との間の膜平衡の研究(Henriques³⁾, Adair⁴⁾), Hb 溶液における Henderson-Hasselbalch 式の pK' の測定(Margaria & Green⁵⁾), 或いは血液の蒸気圧の低下の測定(Margaria⁶⁾), 血液の氷点の低下の測定(Stadie & Sunderman⁷⁾), CO₂ を含む Hb 溶液の滲透圧の測定(Henriques⁸⁾, Adair⁹⁾) がなされてきた。

これらの方法は, いずれもイオンの見掛けの濃度“活動量”を測定しているため, HCO₃⁻の真の濃度を知らずにはならない。イオン強度が高く, しかも Hb という蛋白が共存している溶液の活動係数に関する理論がないこと, 及び実験条件が生理的でないという困難が克服されていないので, これらの方法による成績は不充分で混乱している。

一方, カルバメイトの形で Hb と結合している CO₂ については, carbonic anhydrase を失活せしめた血液又は Hb 溶液について, CO₂ の放出或いは吸収の速さを測定する動力学的な方法, 或いはカルバメイトが, BaCl₂ を過剰に加えても BaCO₃ となつて沈澱しないで残ることを利用した化学的方法によつて探究が行われてきた。Siegfried¹⁰⁾ は血清蛋白について, Faurholt¹¹⁾ は単純なアミノ酸について, Henriques¹²⁾, Ferguson¹³⁾, Stadie 等¹⁴⁾, Roughton 等^{15) 16) 17)} は Hb 溶液についてカルバメイト測定の実験を行った。Ferguson & Roughton¹⁷⁾ は, 血液中の HCO₃⁻ 以

外の形の結合炭酸を X-bound CO₂, この X-bound CO₂ とこの1分割である carbaminohemoglobin との差, 即ちカルバメイト以外の形で Hb と結合している CO₂ を Y-bound CO₂ と命名し,



これらの定量法及び成績について詳細に考察し, その生理的な意義について論及している。

これらによると, O₂ 及び CO は Hb の Fe と結合するのに対して, CO₂ はその蛋白成分 globin と結合するという。このうち -NH₂ 基と結合している CO₂, 即ち carbamino-CO₂ については, 呼吸サイクルにより排出される CO₂ 量の 10~35% がこれに由来すると推定されている。しかし, 今までのところ, X-bound CO₂ 及び Carbamino-CO₂ を定量する確実な方法がないので, これらの存在及び量, 殊に Y-bound CO₂ については確実な知見がない。

この研究は, 蛋白と低分子イン又は低分子化合物との結合について従来用いられてきた限外濾過に遠心力を利用した菓子井^{19) 20)}の装置に改良を加え, 新たに考案した気密遠心管と組合せて, Hb 溶液を一定の pCO₂ 下で迅速に濾過し, Hb と結合して非拡散性の状態にある CO₂ 量を測定する方法を実験的に確立した。

次いで, この定量法を用いて, Hb と結合している CO₂ の存在を確認し, 2, 3の性質を明らかにしたので, その成績を述べ検討したい。

実験方法

本研究は Hb 及びその 2, 3の誘導体の水溶液を一定の pH 及び pCO₂ の条件下で遠心限外濾過を行い, その母液と濾液の CO₂ 含有量を測定し, これより Hb やその誘導体と結合し非拡散性の状態にある CO₂ の量を求めようとするものである。

1. Hb 及びその誘導体溶液の調製

Studies on the Combination of Hemoglobin with CO₂ by means of Centrifugal Ultrafiltration.
Makoto Minoguchi, Department of Physiology (I) (Director : Prof. K. Saito), School of Medicine, University of Kanazawa.

2% 稀酸カリを加えたウシ血液の一定量を約 3,000 r. p. m. で15分間遠心沈澱し、血漿及び白血球層を除き、残った赤血球を 0.9% 食塩水で3度洗う、3度目には 4,000 r. p. m. で45分間遠心沈澱して押しつめ、上澄の食塩水を完全に取り除いた。

この洗った赤血球に等容の蒸留水を加えて溶血液を作り、“ghost”を 3,000 r. p. m. で20分間遠心沈澱して除いた。この溶血液を所要の緩衝液に浮遊させ(次項参照)て、この Hb を還元 Hb とする際には CO_2 と N_2 の混合ガスを通じ、酸素化 Hb とする際には CO_2 と空気を、一酸化炭素 Hb とする際には 10% フェリチンカリを溶血液が褐色となるまで過剰に加え、400 番セロファンをもって、流水中で12時間透析した後所要緩衝液に投じた。

2. 被検液の pH の調節

被検液の限外濾過を行う際、予めその pCO_2 と pH を所要の値に調製しておく必要がある。

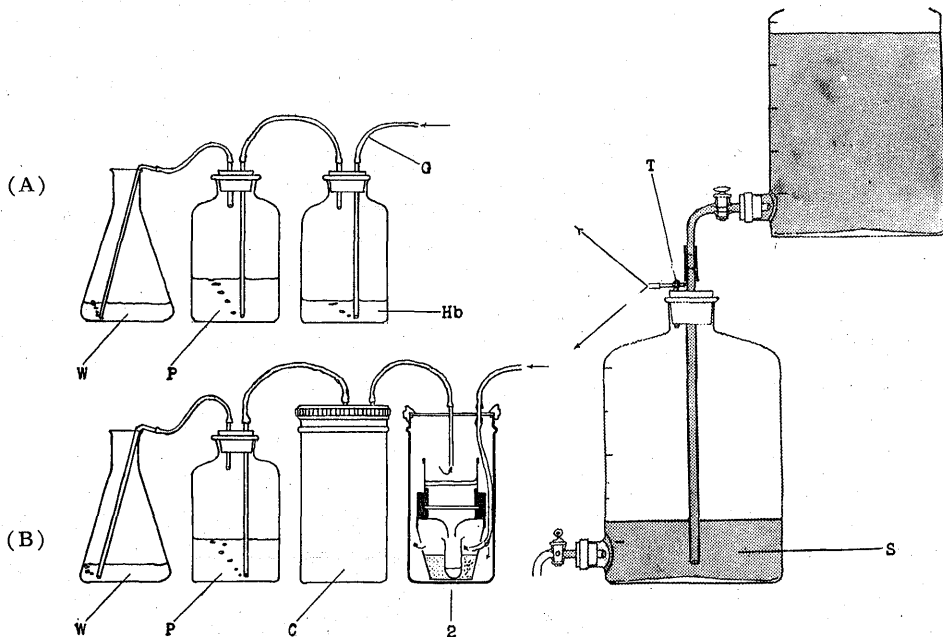
一般に溶液の pCO_2 と pH は相関連し、一方を変動させると他方もこれに伴って変化するから、この両者を所要の値にもつてくるために、pH 溶液に予め適当

量の Sørensen の M/15 磷酸緩衝液を加えた後に所要の pCO_2 を有するガスと平衡せしめた。この際用いる緩衝液の pH と量は理論的に求めることは困難であるから、予め予備実験を行つて経験的に決定した。その 1 例を挙げると、還元 Hb 溶液が pCO_2 20, 40, 60, 100mmHg のガスと平衡に達したときに、この溶液の pH をほぼ還元 Hb の等電点附近にもち来たすためには、Hb の溶液にそれぞれ予め pH 6.67, 6.81, 6.89, 7.16 の Sørensen の M/15 磷酸緩衝液を等量混合しておかなければならない。

3. Hb 溶液とガスの平衡

図 1 に示したように、各 20 ℓ 容のマリオット壺 2 基にゴム栓で 2 方括栓をそれぞれ装着し、上下に肉厚のゴム管で連結し、5% 硫酸を封液としたガス貯溜器を作つた。ガスの流量は、3 方括栓 T を操作して調節した。この 20 ℓ のガスを、20ml Hb 溶液のガスとの平衡及び約 110ml 容の気密遠心管 2 本のガスの置換えに用いた。この貯溜器中に、所要の pCO_2 になるよう、 CO_2 と N_2 、又は CO_2 と空気、又は CO_2 と CO 及び空気を混合調製する。どの混合ガスを用いるかは

図 1 Hb 溶液並びに流動パラフィンのガス平衡、及び気密遠心管内の空気をガスで置換するに用いた装置



(A) Hb 溶液と流動パラフィンのガス平衡に用いた装置

(B) 気密遠心管内の空気をガスで置換するのに用いた装置

Hb : ヘモグロビン溶液 S : 5% 硫酸溶液 2 : 図 2 参照

P : 流動パラフィン T : 三方括栓

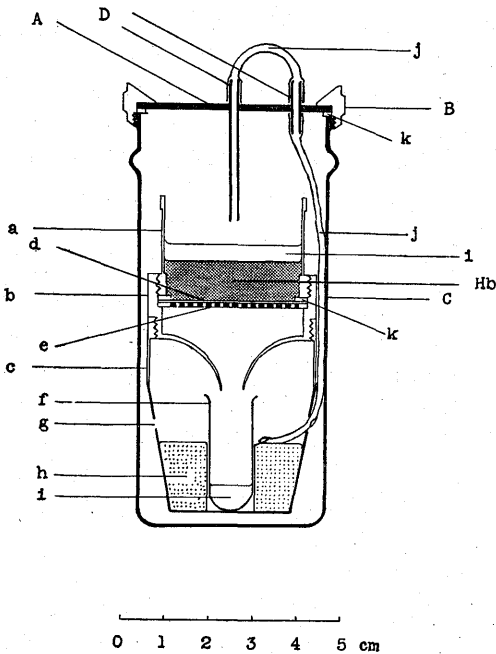
W : 水 G : ゴム管

いうまでもなく実験しようとする Hb の種類によつてきめる。ガスが充分混和するのを待つて、50ml の洗気壺 2 個に、それぞれオクシアルコールを 1~2 滴加えた pH 調節 Hb 溶液を約 20ml 及び流動パラフィン約 25ml を入れ、図 1 の A の如く径 3mm のゴム管で連結し、約 6ℓ のガスを約 20 分間で流して、大気圧下で平衡させる。なお、大気中へのガスの排出は水中を通して行い、外気の混入を防いだ。原ガス及び Hb 溶液を通して排出されたガスを Haldane の装置で分析し、両者の CO₂ 含有量の一致により平衡成立を確認した。

4. 限外濾過装置及び気密遠心管

限外濾過装置は、菓子井¹⁹⁾の報告したものに一部改良を加えたもので(図 2)、気密遠心管のなかに入れ

図 2 遠心の準備を完了した気密遠心管



限外濾過装置

- a : 上 節
- b : 中 節
- c : 下 節
- d : 和紙コロヂオン膜
- e : 目 皿 板
- f : 濾液受容器
- g : ガス 孔

気密遠心管

- A : 金属製蓋
- B : 固定環
- C : 外 筒
- D : ガスパイプ
- J : 径 3mm のゴム管
- h : ゴム 栓
- Hb : ヘモグロビン溶液
- i : ガスと平衡した流動パラフィン
- k : ゴムパッキング

るために高さを上節で短縮し、下節の外側に径 2mm の孔を 3 個あけ、ガスの流入及び流出の便をはかつた。この装置の金属製部分はクロムメッキが施してあるが、更に内面に silicination を施して、金属イオンの溶液中への遊離を防いだ。気密遠心管は、図 2 に示すように、内径 3.9cm、高さ 9.5cm の普通の遠心器の 50ml 遠心管で上縁の外にネジを切つた金属製外筒、内径 1.5mm のガスパイプ 2 本が中央と外側に穿通した外径 4.3cm、厚さ 1.5mm の円形金属製の蓋、及び金属製固定環よりなる。固定環はゴムパッキングを介し、蓋を外筒に固定密着する。2 本のガスパイプを径 3mm のゴム管で連結して密閉は完了する。

5. 濾 膜

和紙コロヂオン標準膜²⁰⁾を用いた。この膜による濾液収量は、この実験では Hb 濃度が約 8g/dl で比較的にかつたにも拘らず、3,000 r.p.m. 30~60 分の遠心で試料約 7ml のばあい平均 0.4ml 内外であつた。又この実験に用いた緩衝液及び NaHCO₃ 溶液について限外濾過実験を行い、溶質が膜に吸着されないこと、及び限外濾過性であることを予め確かめた(表 1)。

6. 特定のガス張力のもとでの限外濾過

気密遠心管の中の空気を、所要のガスでおきかえて、特定のガス張力のもとで濾過を行つた。図 2 に見るように、濾過装置の下節のなかにゴム栓にたてた受器を入れ、濾膜を目皿に重ねてゴムパッキングで上中節間にネジで装着固定し、上節には特定のガスと平衡した Hb 溶液 7~8ml を入れる。濾液を受ける受器のなか、及び上節の試料の上には、実験に用いた同一のガスと平衡せしめた流動パラフィンを重積して、試料から水分の蒸散やガスの脱出の起ることを防いだ。

気密遠心管の蓋の外側ガスパイプに、途中に 1~2 側孔をもつ径 3mm のゴム管をつけ、その下端を下節のガス流通孔を通して充分深く下節内に挿入したら、素速く限外濾過装置を遠心管のなかに入れ固定環で蓋をしめ、図 1 の B に見るように、外側ガスパイプから径 3mm のゴム管を介して、Hb 溶液の平衡に用いたガス約 15ℓ を急速に送り込み、遠心管のなかの空気とおきかえる。

ガス分析でガスの置換を確かめたら、ガスを流しながら 2 本のガスパイプを図 2 のように径 3mm のゴム管で連結密閉して、約 3,000 r. p. m. で 30~60 分遠心する。

7. 測 定

かくて得られた濾液、及び予めガス平衡流動パラフィンを入れた試験管内に注射器で気密に移注した母液

表1 約 25mEq/L NaHCO₃ 溶液及び M/15 Sørensen
 磷酸緩衝液の限外濾過実験成績

約 25 mEq/L NaHCO ₃ 溶液			1/15 M. Sørensen 磷酸緩衝液	
総 CO ₂			pH	
	母液 Vol. %	濾液 Vol. %	母液	濾液
	47.60	46.49	6.258	6.258
	46.56	46.70	6.256	6.256
	46.69	47.81	6.827	6.829
	47.12	47.34	6.829	6.831
平均	46.99	47.08		

について、次の諸測定を行った。

イ) pH 測定 容量約 0.02ml の U 型硝子電極²³⁾ を作製し、Dubridge-Brown の配線による真空管電位計 (UX-54 使用²³⁾²⁴⁾ を用いて、対償法的に油恒温槽中にて測定した。

ロ) 濾液並びに母液の全 CO₂ 量 Copp-Natelson の微量血液ガス分析装置を用いて 4~8 回測定し、その平均値をとった。更に母液について Van Slyke の測圧式装置で 2 回分析して、この値を基準として Copp-Natelson 装置による測定値に補正を加えた。

ハ) Hb 濃度 cyanmethemoglobin²⁵⁾ として、530 mμ で光電比色的に測定した。標準曲線は Van Slyke の測圧式装置で酸素結合能を測定し、酸素 1.36ml 当り Hb 1g として作製した。

ニ) 母液水分 母液の乾燥重量を測定して求めた。即ち母液約 1ml を既知重量の小ビーカーにとり、110 °C、1 時間乾熱し、その前後の重量の差をもつて母液水分とした。

Hb とガスの平衡、限外濾過、pH 測定、ガス測定は同一実験室内で、従つてほぼ同じ温度で行つた。試料とガスの平衡、気密遠心管の中のガスの置換、及び濾過を恒温槽のなかで行ふことによつて、特定の温度でガスと平衡している試料の分析が可能となる。

Hb と結合している CO₂ 量の計算

熱力学的考察並びに実験的所見より、限外濾過と透析は全く同等と考えてよい²⁶⁾²⁷⁾。即ち限外濾液の全 CO₂ 濃度は、母液中の Hb と結合しないで残っている CO₂ の濃度に等しい。従つてこの場合、母液中の全 CO₂ を知れば、Hb に結合している CO₂ の量を求めることが出来る。但し、この方法を実際に用いるにあつては、第 1 に Donnan 効果のイオンの分布に及ぼす影響を考慮して、その補正を加えるか、又はこの効果を見無視出来るような条件を選ぶ必要がある。Hb 溶液を pH 6.54 及び 7.77 で濾過した実験では、

母液と濾液の pH の差より Donnan 比を求め、一方濾液の総 CO₂ と pH より Henderson-Hasselbalch 式を用い pK' = 6.46 (炭酸の 25°C における第 1 段の解離恒数) として HCO₃⁻ 量を算出し、この HCO₃⁻ 量に対して補正を行った。Hb の等電点近くの pH、即ち 6.65~6.8 pH で濾過した実験では、母液と濾液の間に水素イオン濃度の差は見られなかつた。

第 2 に膜自身が溶質を吸着することによる誤差を考え、予め吸着の有無を調べる必要がある。この実験では、膜による吸着のないことは既に述べた。第 3 に膜水分の移行による濾液の稀釈が考えられるが、Hb の濃度が高く (平均 8g/dl)、濾液が大約 0.4ml も得られたような場合には無視出来ることが知られている²⁸⁾。又濃度については、限外濾過によつて Hb を除いた濾液の濃度から、Hb を含んでいる母液の溶媒中の濃度を推算しようとするのであるから、その濃度の表現に注意を要する。この場合は、濾液については水 100ml 当りとして、母液については母液 100ml 当りとして表現し、母液 100ml の中に占める水の量を測定して水分補正を行った。

以上を式に要約すると

$$\text{Hb と結合している CO}_2 = \text{母液の全 CO}_2 - \text{母液内の拡散性 CO}_2$$

ここで母液中及び濾液中に物理的に溶存している CO₂ の濃度は等しいから、CO_{2F} = CO_{2M} とすれば

$$\text{母液内の拡散性 CO}_2 = [\text{CO}_{2F} + (\text{HCO}_3^-)_M] \times \frac{W}{100}$$

となる。

但し、M は母液を、F は濾液を表わす。

() は水 100ml についての濃度

W は母液水分の百分比

なお母液の水分はすべて溶媒水であると仮定した。

実験成績

1. pH の影響

表2 pHとウシの還元Hbと結合しているCO₂量との関係

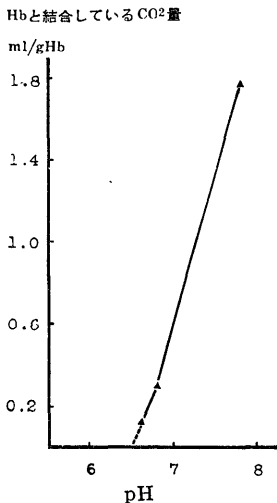
実験温度 °C	母液のpH	Hbと結合しているCO ₂ 量 ml/g Hb
25~26	6.54±0	0.13±0.0005
24~28	6.81±0.051	0.31±0.051
25~26	7.77±0.011	1.79±0.14

pCO₂=40mmHg

pH 6.81 で濾過した実験は9例, 他は4例何れも4~8回のガス分析値の平均に標準偏差を附した.

Hbと結合しているCO₂の量が, その溶媒のpHの変動によつてどのように影響されるかを見るために, ウシの還元Hbを用いて, 温度25~26°C, 40mmHg pCO₂の条件で, 溶媒のpHを6.54, 6.81及び7.77に調節して限外濾過を行つた. 成績を表2に総括し, 図3に, 横軸のpHに対応するHbと結合しているCO₂の量をml/Hbとして表現した. 用いたpH域では, Hbの酸変性及びアルカリ変性は起きないと考えてよい. 一方, このpH域ではDonnan効果を無視出来ない. 成績は計算の項に述べたように, HCO₃⁻量に対してDonnan補正を施してある. これらの成績は, Hbと結合せるCO₂量とpHの関係は直線的で, pHの上昇につれてHbと結合せるCO₂量の増加することを示している.

図3 pHとウシの還元Hbと結合しているCO₂量との関係



pH=6.81の点は9例, 他は4例の平均

今, 単位のpH変動に対するHbと結合せるCO₂量の変動を算出すると,

$$\frac{d(\text{Hb} \cdot \text{CO}_2)}{dpH} = 1.34 \text{ ml/Hb/pH}$$

となり, HbとCO₂との結合はpHに極めて鋭敏

であることが知れる. 試みに, 直線が横軸と交わる点, 即ちHbと結合せるCO₂量が零となるpHを求めてみると約6.5となる.

2. pCO₂と各種Hbと結合するCO₂量との関係
pCO₂とHbと結合せるCO₂量との関係を, 還元Hb, 酸素化Hb, 一酸化炭素Hb及びメトHbについて調べた. 即ち, 室温で, 溶液のpHをHbの等電点近くに固定して, pCO₂のみを20, 40, 60, 100mmHgと変えて濾過を行つた. 図4, 5及び表3にその成績をまとめた.

これら4種のHbについてそれぞれ別に行つて得た成績について, 一般的にいえることは, pCO₂の低い所, 大体60mmHg以下の所では, pCO₂の変化とHbと結合せるCO₂量がほぼ比例して増減するのに対して, 60mmHg以上では, pCO₂の変化に比してHbと結合せるCO₂量の変化が小さいということである. そして, いずれのHbの場合でも100mmHg pCO₂前後でHbと結合せるCO₂量がある一定量に近づいている, 即ちある極限をもつて見えるように見える.

Hb及びその誘導体のCO₂に対する親和性の差が明らかに認められるが, 図4, 5からわかるように, 還元Hb及びメトHbのCO₂に対する親和性は, 酸素化Hb及び一酸化炭素Hbのそれに比べて高い. 前2者及び後2者はそれぞれ殆んど同一で, 作図上曲線を別けることは難しい. 今, 図の上から還元Hbと酸素化Hbに結合しているCO₂量の差を求めて, 同一図の上を表わすとほぼ直線となり, pCO₂の上昇に比例して増加している. 又, 次式で与えられるfを20, 40, 60, 100mmHg pCO₂に対して求めてみると

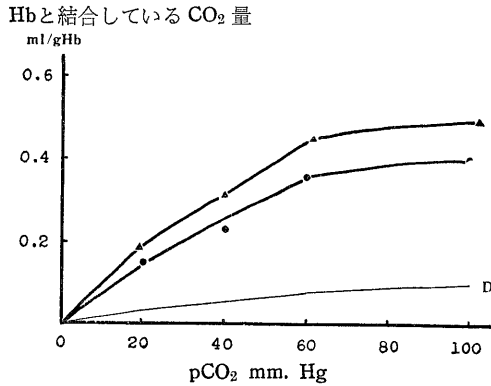
$$f = \frac{\text{還元Hbと結合しているCO}_2\text{量}}{\text{酸素化Hbと結合しているCO}_2\text{量}}$$

pCO ₂ mmHg	20,	40,	60,	100
f	1.18	1.19	1.21	1.22

となり, fはpCO₂と無関係な一定数となる.

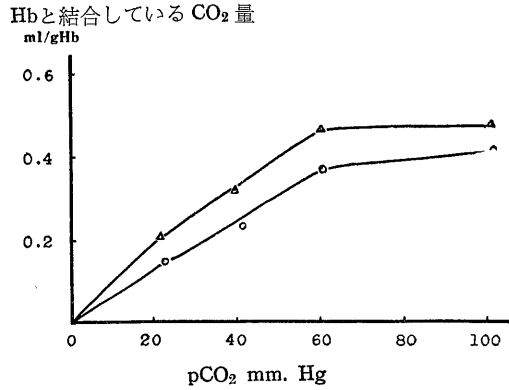
即ち, 還元Hbと結合しているCO₂量は, pCO₂の値に拘らず, 酸素化Hbと結合しているCO₂量の約1.2倍である.

図4 還元 Hb 及び酸素化 Hb の X-bound CO₂ 解離曲線



- ▲ : ウシの還元 Hb (20mmHg 6例, 40mmHg 9例, 60mmHg 8例, 100mmHg 7例の平均)
- : ウシの酸素化 Hb (各点 4例の平均)
- D : ウシの還元 Hb 及び酸素化 Hb と結合している CO₂ 量の差

図5 メト Hb 及び一酸化炭素 Hb の X-bound CO₂ 解離曲線



- △ : ウシのメト Hb (各点 4例の平均)
- : ウシの一酸化炭素 Hb (各点 4例の平均)

表3 種々の pCO₂ 下で、還元 Hb、酸素化 Hb、一酸化炭素 Hb 及びメト Hb と結合している CO₂ の量

pCO ₂ mm. Hg		pCO ₂ mm. Hg	Hb と結合して いる CO ₂ 量 ml/g Hb	母液の pH	実験温度 °C.
20	red-Hb	19.04±0.08	0.19±0.062	6.84~6.86	27~28
	O ₂ -Hb	20.40±0.83	0.16±0.041	6.81~6.88	19~22
	CO-Hb	22.78±0.10	0.15±0.030	6.82~6.86	19
	met-Hb	21.62±0.34	0.21±0.065	6.76~6.77	17
40	red-Hb	39.77±1.38	0.31±0.051	6.72~6.88	24~28
	O ₂ -Hb	39.98±0.51	0.23±0.040	6.84~6.85	22~23
	CO-Hb	41.21±1.50	0.23±0.034	6.75~6.76	18
	met-Hb	39.03±0.29	0.32±0.058	6.71~6.73	16~17
60	red-Hb	61.18±1.76	0.45±0.083	6.81~6.85	20~23
	O ₂ -Hb	59.44±0.20	0.37±0.089	6.75~6.76	20~21
	CO-Hb	60.85±1.47	0.37±0.007	6.74	18~19
	met-Hb	60.24±0.59	0.47±0.137	6.70~6.71	16~17
100	red-Hb	102.80±3.31	0.49±0.067	6.77~6.80	24~27
	O ₂ -Hb	99.73±0.61	0.40±0.056	6.74~6.76	20~21
	CO-Hb	101.90±0.12	0.42±0.061	6.72~6.73	19
	met-Hb	101.58±1.64	0.47±0.042	6.67~6.70	17~19

還元 Hb は、pCO₂=20mmHg 6例, 40mmHg 9例, 60mmHg 8例, 100mmHg 7例
他はすべて 4例で、何れも 4~8 回のガス分析値の平均に標準偏差を附した。

考 按

一定の pCO₂ のガスと平衡している Hb 溶液を、そのガス雰囲気のもとで遠心限外濾過して、非拡散性 CO₂ の量を求めた。

用いた試料のなかには、非拡散性の化合物として存

在するのは Hb だけであると考えて実際上きつつかえなく、この Hb の酸素化或いは還元等によつて非拡散 CO₂ の量が影響をうける事実より、この非拡散性 CO₂ は Hb と結合している CO₂ であることが推測出来る。

この Hb と結合している CO₂ の量は 20°C 前後で、溶液の pH を Hb の等電点、即ち pH 6.8 附近に

固定して、種々の Hb を用いて、pCO₂ を 20 から 100 mmHg に亘つて変えた実験より、pCO₂ が 20 から 100 mmHg に逐次増加すると、還元 Hb 及びメト Hb の 1g と結合している CO₂ は、0.2ml から 0.5ml に増加する。即ち酸素結合能 1.36ml O₂/gHb の 15% から 36% の CO₂ と結合する。酸素化 Hb の 1g は、0.14ml から 0.4ml の CO₂ を、即ち酸素結合能の 10% から 29% の CO₂ を結合している。

Ferguson & Roughton¹⁷⁾ は、同じウシの還元 Hb について、pH 7.3, 35mmHg pCO₂ で、38°C の場合に、Heme 1 分子に対し約 1/4mol の CO₂ がカルバミノ結合していることを見ている。Ferguson¹³⁾ は、ヒト還元 Hb では、38°C, pH 7.24, 43mmHg pCO₂ で、還元 Hb 1g 当り 0.35ml, 即ち Heme 1 分子に対しほぼ 1/4mol の CO₂ がカルバミノ結合をするという。

Stadie & O'Brien¹⁴⁾ によると、38°C, pH 7.39, 47mmHg pCO₂ のとき、ウシ還元 Hb の 1g は、約 0.4ml, 即ち Heme 1 分子に対しほぼ 1/4mol の CO₂ がカルバミノ結合をするという。これら 3 者は、条件の不一致にも拘らず、還元 Hb の場合、Heme 1 分子に対し約 1/4mol のカルバミノ CO₂ が結合しているという。著者がウシの還元 Hb について、24~28°C, pH 6.81, 40mmHg pCO₂ で得た 0.32ml/g Hb 即ち Heme 1 分子に対し約 1/4mol の CO₂ が結合しているという成績は、図 3 より得られる pH 係数を用いて、pH 6.8 を pH 7.35 に補正すると、約 1.0ml/g Hb となり、前記 3 者の約 3 倍の 3/4mol CO₂ が Heme 1 分子に結合することを示す。

この Hb と結合している CO₂ の量は、pH の変動によつて影響をうけるが、ウシの還元 Hb については、単位 pH の変動に対応する X-bound CO₂ の変動は図 3 の如く、1.34ml/Hb/pH であつて、CO₂ と Hb の結合が pH の変化に対して鋭敏であることを示している。

Ferguson & Roughton¹⁷⁾ が、ウシの還元 Hb について、38°C においてカルバミノ CO₂ に及ぼす pH 効果を見た成績より、上と同様にカルバミノ結合の pH 係数を求めると約 1.12ml/Hb/pH となり、著者の得た係数よりもやや小さい。

これは X-bound CO₂ の一部を占める Y-bound CO₂ の pH 係数がカルバミノ CO₂ の pH 係数にくらべて大きいためであろうと考えられる。図 3 の諸点を連ねる直線が横軸と交わる点を外挿法で求めると、交点の pH は約 6.5 となる。即ち著者の用いた還元 Hb の溶液の pH を 6.5 とすると、その X-bound

CO₂ は零になる。かつて当教室の西田²⁰⁾ が赤血球内容の等電点は結晶 Hb のそれよりも明らかに低く、凡そ pH 6.5 付近にあることを観察している。Hb の等電点は結晶した標品では pH 6.8 であつても赤血球内にあるものは pH 6.5 付近に位する可能性も否定することは出来ない。この実験に用いた Hb 溶液は溶血液であるから、その等電点は pH 6.5 付近にあると推定出来、反応が pH 6.5 まで酸性化したとき X-bound CO₂ が消失する実験所見は、X-bound CO₂ の一分割であるカルバミノ CO₂ が Hb の等電点以下では存在しないという事実より、今一つの分割 Y-bound CO₂ も Hb の等電点以下では存在しないことを示していると考えられる。

図 4, 5 は、ほぼ同一条件下で、還元 Hb, 酸素化 Hb, 一酸化炭素 Hb, メト Hb とそれぞれ結合する CO₂ の量を異にしていることを明らかにしている。還元 Hb 及びメト Hb は、酸素化 Hb 及び一酸化炭素 Hb に比べて、CO₂ を明らかに多く結合している。しかもその程度は、前 2 者及び後 2 者は殆んど同じであるという成績は、ヘム鉄の結合様式が、前 2 者はイオン結合であり、後 2 者は共有結合であるという事実と対応している。

Ferguson & Roughton¹⁷⁾ は、38°C で、ウシ還元 Hb は酸素化 Hb の約 3 倍強のカルバミノ CO₂ を結合するという。Stadie & O'Brien¹⁴⁾ は、ウマ及びウシの Hb について、約 1.7 倍という。

Ferguson¹³⁾ はヒトの Hb のばあい、約 2.3 倍という。Wyman²²⁾ は約 1.6 倍と推算している。著者の X-bound CO₂ についての成績は、pCO₂ に関係なく、還元 Hb は酸素化 Hb の約 1.2 倍の X-bound CO₂ を結合していることを示した。

この Hb と可逆的に結合している CO₂ の量と、これに影響を与える要因を考察したが、CO₂ と Hb の結合状態については、著者の実験からは明らかにし得ない。著者の測定した所謂 X-bound CO₂ は、その一分割としてカルバミノ CO₂ を含んでいること、及び X-bound CO₂ とカルバミノ CO₂ の差、即ち未知の Y-bound CO₂ を含むという推定が従来¹⁷⁾ によりなされてきている。ここで、著者の得た X-bound CO₂ についての成績と、カルバミノ CO₂ についての今までの研究と比較考察し、Y-bound CO₂ の存否、或いはその量について検討したい。

カルバミノ CO₂ については、Faurholt¹¹⁾ は単純アミン及びアミノ酸について、これらと CO₂ の間のカルバメイト平衡の実験から、CO₂ は -NH₂ 基と結合するが、-NH₃⁺ 基とは結合しないこと、-NH₂ 基は

H₂CO₃, HCO₃⁻ 或いは CO₃⁼ とは結合しないということ
を明らかにしている. 又 Meldrum & Roughton¹⁵⁾
は, Faurholt のアミノ酸等 について得た結果が, ア
ミノ酸の複雑な結合物である蛋白体 Hb にも適応され
るという証拠を提出した.

即ち $\text{PNH}_2 + \text{CO}_2 \rightleftharpoons \text{PNHCOOH} \rightleftharpoons \text{PNHCOO}^- + \text{H}^+$
それによると, Hb のイオン化は単純アミノ酸と全く
同様で, CO₂ は Hb⁻ とのみ結合し等電点 Hb の
Zwitterion とは結合しないという. Hb の等電点及び
それ以下の pH 域ではカルバメイト形成が起らないと
いう結論になる. Stadie & O'Brien¹⁴⁾ がウマ及びウ
シの Hb についてカルバメイト定量を行った成績によ
れば, 等電点 pH 6.74 或いはそれ以下の pH では,
92mmHg 或いは 532mmHg という高い pCO₂ にも
拘らず, カルバミノ Hb の形成は殆んどないという.

著者が還元 Hb, 酸素化 Hb, 一酸化炭素 Hb 及びメ
ト Hb について, それぞれ等電点近くの pH で, 種々
の pCO₂ で濾過した実験, 或いは還元 Hb について,
40mmHg pCO₂ で, pH 6.54 から 7.77 に亘って行
った実験の成績では, 図 3, 4, 5 から明らかなよう
に, 所謂 Hb の等電点 pH 6.8 附近においても, Hb
と結合している CO₂ の存在し, pH 約 6.5 に至つて
消失することを示している.

Hb の等電点附近の pH では, カルバメイトは存在
しないという前記諸家の成績は, 結晶Hbについて得ら
れたものであり, 著者は溶血液を用いたので, 前記の
成績がそのまま著者の場合に適否出来るか否か疑問が
ある. しかし, 一応この成績を承認すれば, 著者の観
察した Hb と結合している CO₂ 量のなかには, Hb の
等電点附近ではカルバメイト 結合をしている CO₂ は
ないか, あつても少ないと推定される. 即ち, Hb と
結合している CO₂ として定量されたものの中にカル
バメイト CO₂ 以外の, Roughton のいう Y-bound
CO₂ が含まれていることが示唆される.

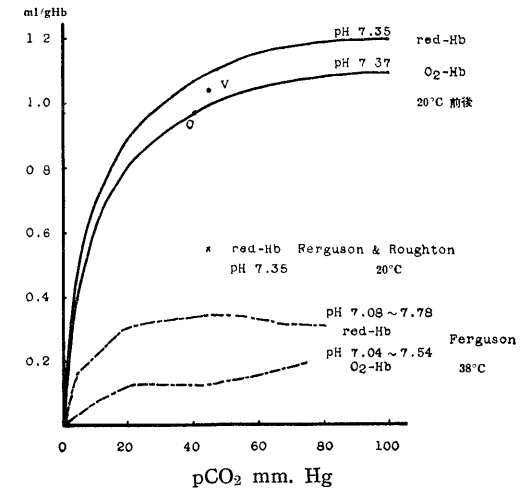
この推定を確かめるために, Ferguson & Roughton
¹⁷⁾ がウシの結晶 Hb 溶液についてカルバミノ CO₂ を

化学的な方法によつて定量した成績, 及び Ferguson
¹⁸⁾ がヒト結晶 Hb について同様の方法で定量したカ
ルバミノ CO₂ の成績を, 著者のウシ還元 Hb 溶液に
ついて得た成績と比較してみたい.

これらの測定は異なつた条件下で行われているから,
先ず同一条件下の測定値に補正する必要がある.
温度係数については, Ferguson & Roughton¹⁷⁾ の成
績より求めると, -0.13ml/Hb/10°C となるが, 著者
自身の成績はないので, Ferguson の成績はそのまま
比較した.

即ち著者の pH 6.81 近くで得た成績 (図 4) を,
ウシ還元 Hb について得た X-bound CO₂ の pH 係
数を用いて, pH 7.35 に補正し, Ferguson 及び
Ferguson & Roughton の成績を合せて 3 者を同一図
に記入し比較した. Ferguson 及び Roughton 等のカ
ルバミノ CO₂ は ml/g Hb に換算した. この図 6 よ
り, Ferguson & Roughton のカルバミノ CO₂ は同

図 6 還元 Hb 及び酸素化 Hb の X-bound
CO₂ 及びカルバメイト CO₂ 解理曲線
Hb と結合している CO₂ 量



O, V : pCO₂ 及び動静脈血の酸素飽和度より
求め動脈血及び混合静脈血の位置

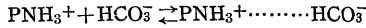
		温度 °C	pH	pCO ₂ mmHg	カルバミノ CO ₂ vol. % per 10mmHb	X-bound CO ₂ ml/gHb
Ferguson & Roughton ¹⁷⁾	ウシ結晶還元 Hb	20	約 7.3	44.5	9.1	
Ferguson ¹⁸⁾	ヒト結晶還元 Hb	38	約 7.78	15.9	2.31	
	"	"	7.43	32.2	4.45	
	"	"	7.24	45.7	5.05	
	"	"	7.08	58.7	4.48	
著 者	ウシの還元溶血液	20~28	6.81	20~100		0.19~0.4

一 pCO₂ で著者の得た X-bound CO₂ はほぼ $\frac{1}{2}$ に当り、Ferguson の成績はほぼ $\frac{1}{3}$ に当る。残りの $\frac{1}{2}$ 〜 $\frac{2}{3}$ は所謂 Y-bound CO₂ と推定されることになる。

この Y-bound CO₂ が何であるかということについて、今までのところはつきりとした説は見当らない。

W. Pauli²⁹⁾³⁰⁾ は48時間電気透析して塩類を完全に除いた2%結晶 Hb 溶液に Ca (HCO₃)₂ を加えて起る、溶液の電気伝導度、アルコールによる Hb の凝固等の変化を観察し、HCO₃⁻ が Hb の正荷電基と結合して重炭酸塩を作る結論している。

即ち



Hb の-NH₃⁺ 基は、Hb の等電点 pH 或いはそれより酸性側 pH で存在する。従つて、アンモニウム重炭酸塩形の Hb と結合している CO₂ が、著者の測定した X-bound CO₂ に含まれていると考え、著者の見た pH の低下と共に X-bound CO₂ は減少し、ついに pH 約 6.5 以下の所では消失するという成績と一致しない。これに対し、Sidwell et al³¹⁾ は種々の Anion の共存が Hb の O₂ に対する親和性に大きな影響を与える事実を観察し、これより NaHCO₃ と Hb の間に単純な Ion 結合でない結合を推測している。

これらの形の Hb と結合している CO₂ が、著者の測定した X-bound CO₂ に含まれている可能性は、少なくとも Pauli のいうアンモニウム重炭酸塩形の CO₂ と Hb の結合については非常に小さい。

最後に、呼吸サイクルに占める X-bound CO₂ の CO₂ 運搬についての役割を量的に観察したい。そのために、動脈血及び混合静脈血の性状を次の如く仮定し、

	pH	pCO ₂ mmHg	総炭酸 vol. %	Hb の酸 素飽和度 %
混合静脈血	7.35	45~50	53~55	70
動脈血	7.37	40	50	95

R. Q.=0.85, 血液の Hb 濃度を 14% とすると、血液 100ml が 1呼吸サイクルにより排出する CO₂ の量は 4ml となる。このうち X-bound CO₂ の占める割合を推算するために、pH 6.8 附近で、完全還元化 Hb 及び完全酸素化 Hb について得た X-bound CO₂ の定量成績を、上記混合静脈血及び動脈血の pH 7.35 及び 7.37 に、還元 Hb について得た pH 係数 1.34 ml/Hb/pH を酸素化 Hb の場合にも適応してそれぞれ換算し、図 6 に記入した。この酸素化 Hb の X-bound CO₂ の解離曲線上に、上記動脈血の pCO₂ に対応する点を定め 0 とし、静脈血の pCO₂ に対応す

る 47.5mmHg 線上に、動静脈血の酸素飽和度を考慮して、還元 Hb 及び酸素化 Hb の X-bound CO₂ 解離曲線の間で酸素化 Hb の X-bound CO₂ 解離曲線寄り $\frac{1}{4}$ の所に混合静脈血の位置を定め V とした。

OV 間の x-bound CO₂ の差は 0.06ml/g Hb となる。従つて Hb 濃度 14% の血液 100ml が肺において静脈血から動脈血に変化すると 0.84ml の X-bound CO₂ が 1呼吸サイクルにより排出される訳であるから、呼吸サイクルにより血液 100ml より排出される全 CO₂ 量の約 15% が X-bound CO₂ に由来すると推定される。

この値は、Ferguson & Roughton¹⁷⁾ がカルバミノ CO₂ について推定した 40%、Ferguson¹³⁾ の 30%、Stadie & O'Brien¹⁴⁾ の 18% より小さく、Wyman³²⁾ が推算した 10% よりやや大きい。

結 語

1. 所要の温度で、所要のガスと平衡させた試料を、そのガス雰囲気のもとで遠心限外濾過する装置を考按し、その諸特性を述べた。

2. この気密遠心限外濾過法による、特定の温度、pH ならびに pCO₂ のもとで Hb と結合している CO₂ の定量法を実験的に確立した。

3. 適当な条件で、ウシの Hb と結合している CO₂ の存在を確かめた。この Hb と結合している CO₂ は、pCO₂ の上昇に比例して増加するが、60mmHg 以上では pCO₂ の影響は少なく、100mmHg 前後で或る極限をもっていると考えられる。

4. CO₂ と Hb の結合は pH の変化に対して鋭敏で、X-bound CO₂ は pH 6.5 以下では存在しないが、pH がこれより増すに従つてほぼ直線的に増加する。

単位の pH 変動に対応する X-bound CO₂ の変動は $\frac{d(\text{Hb} \cdot \text{CO}_2)}{dpH} = 1.34\text{ml/Hb/pH}$ となつた。

5. Hb の CO₂ に対する親和性がヘム鉄の結合様式によつて影響を受けることを観察した。

ヘム鉄がイオン結合をしている還元 Hb 及びメト Hb の CO₂ に対する親和性は、共有結合をしている酸素化 Hb 及び一酸化炭素 Hb にくらべて高い。

6. Ferguson 及び Ferguson & Roughton のヒト及びウシの還元 Hb について得たカルバミノ CO₂ の成績は、ほぼ同じ条件の著者の X-bound CO₂ の約 $\frac{1}{3}$ 〜 $\frac{1}{2}$ となり、約 $\frac{1}{2}$ 〜 $\frac{2}{3}$ は Y-bound CO₂ と推定される。

この Y-bound CO₂ は pH 6.5 以下では存在しないことが観察された。

7. $R. Q. = 0.85$ とすると, 呼吸サイクルにより排出される CO_2 の約15%が X-bound CO_2 に由来すると推定される.

終りに, 御懇篤なる御指導並びに御校閲を賜わつた斎藤教授に深謝致します.

文 献

- 1) Bohr, C. : Handbuch der Physiologie des Menschen, p. 71, Braunschweig F. Vieweg und Sohn, 1909.
- 2) Newton, W. H. : Evan's recent advances in physiology, 5 th Ed., p. 143, London J. & A. Churchill, 1936.
- 3) Henriques, O. M. : Biochem. Ztschr., 200, 1 (1928).
- 4) Adair, G. S. & Adair, M. E. : Biochem. J., 28, 199 (1934).
- 5) Margaria, R. & Green, A. A. : J. Biol. Chem., 102, 611 (1933).
- 6) Margaria, R. : J. Physiol., 73, 311 (1931).
- 7) Stadie, W. C. & Sunderman, F. W. : J. Biol. Chem., 91, 227 (1931).
- 8) Henriques, O. M. : Biochem. Ztsch., 260, 58 (1933).
- 9) Adair, G. S. : J. Biol. Chem., 63, 503 (1925).
- 10) Siegfried, M. : Ztschr. Physiol., Chem., 44, 85 (1905).
- 11) Faurholt, C. : J. chim. physiq., 22, 1 (1925).
- 12) Henriques, O. M. : Ergebn. Physiol., 83, 87 (1929).
- 13) Ferguson, J. K. W. : J. Physiol., 83, 40 (1917).
- 14) Stadie, W. C. & O'Brien, H. : J. Biol. Chem., 117, 439 (1937).
- 15) Meldrum, N. U. & Roughton, F. J. W. : J. Physiol., 80, 143 (1934).
- 16) Ferguson, J. K. W. & Roughton, F. J. W. : J. Physiol., 83, 68 (1935).
- 17) Ferguson, J. K. W. & Roughton, F. J. W. : J. Physiol., 83, 87 (1935).
- 18) Roughton, F. J. W. : Physiological Review, 15, 241 (1935).
- 19) 菓子井幸則 : 日本生理誌., 20, 318 (1958).
- 20) 斎藤幸一郎・蓮村成子 : 日新医学, 46, 689 (1959).
- 21) Hawk, Oser & Summerson : Practical physiological chemistry, 12 th Ed., p. 447, New York The Blakiston Co., 1953.
- 22) 斎藤幸一郎・本田良行 : 日新医学, 42, 167 (1955).
- 23) Honda, Y., Nomura, H. & Minoguchi, M. : Jap. J. Physiol., 7, 137 (1957).
- 24) 斎藤幸一郎 : 呼吸と循環, 6, 4 (1958).
- 25) 鴨谷亮一 : 日新医学, 36, 452 (1949).
- 26) Grollman, A. : J. Gen. Physiol., 9, 813 (1926).
- 27) Flexner, L. B. : J. Biol. Chem., 121, 615 (1937).
- 28) 西田悦郎 : 日本生理誌., 19, 45 (1957).
- 29) Pauli, W. und Stenzinger, T. : Biochem. Ztschr., 205, 71 (1929).
- 30) Haurowitz, F. : Chemistry and biology of proteins, p. 74, New York Academic press Inc., 1950.
- 31) Sidwell, A. E., Munch, R. H., Gunzman, Barron, E. S. & Hogness, T. R. : J. Biol. Chem., 123, 335 (1938).
- 32) Wyman, J. : Advances in protein chemistry, 4, p. 407, New York Academic press Inc., 1948.

Abstract

By using the centrifugal ultrafiltration method, the combination of CO_2 with hemoglobin (Hb) in the hemolysate of bovine erythrocytes was studied under various conditions of pCO_2 and pH.

The Hb-bound CO_2 measured in this experiment was so-called x-bound CO_2 consisting of well-known carbamino CO_2 and y-bound CO_2 of unknown identity.

Following results were obtained:

1. X-bound CO_2 can exist in the pH range higher than 6.5, and increased in amount with rising of pH value at the rate of 1.34 ml/gm Hb/pH. As the iso-electric point of the hemolysate has proved to be nearly pH 6.5, the pH range where the combination of CO_2 with Hb is possible is found to be limited to the alkaline side of the iso-electric point of the content of erythrocytes.

2. The relationships of x-bound CO_2 and pCO_2 , CO_2 dissociation curves, in Hb, HbO_2 , $HbCO$ and methemoglobin solutions were investigated at pH 6.8. CO_2 dissociation curves thus obtained were closely similar in shape to that of blood, and the curves of Hb and

methemoglobin solutions, and those of HbO₂ and HbCO respectively coincide with each other. From these findings Hb and methemoglobin are found to be able to combine with 1.2 times as much CO₂ as HbO₂ and HbCO do.

3. It is generally accepted that reduced Hb can combine with CO₂ of 1/4 equivalent as carbamino-compound under the physiological conditions. From our results it is roughly estimated that x-bound CO₂ of reduced Hb is about 3/4 equivalent and that y-bound CO₂ amounts to 1/3 to 1/2 equivalent to Hb.

4. About 15% of the CO₂ expelled in expiratory air is estimated to originate from the x-bound CO₂ in the blood.
