

# 血清透析性カルシウムの新定量法

金沢大学医学部耳鼻咽喉科学教室(主任 松田竜一教授)

岩 脇 昭

(昭和33年11月11日受付)

本論文の要旨は第124回, 第125回日本耳鼻咽喉科学会北陸地方会, 第6回中部地方連合会にて発表した。

## A New Method for Quantitative Determination of Serum Dialyzable Calcium

AKIRA IWAWAKI

*Department of Otorhinolaryngology, School of Medicine Kanazawa University.*

(Director : Prof. Dr. R. Matsuda)

### ABSTRACT

(1) Both total calcium and nondialyzable calcium in each 0.1 ml. of serum are determined separately by means of titrating of 0.001 N-E. D. T. A. solution, using 0.0005 mol Plasma Corinth B solution as an indicator, and keeping the serum solution in strong alkalinity. The alkaline density of the medium becomes as strong as nearly 1N-NaOH solution at the end of the reaction.

(2) In this method, the principle of the separation of dialyzable calcium from nondialyzable one is based on that of quantitative determination of serum dialyzable calcium by Mr. Yanagisawa... (In a period from 2 to 5 minutes after 0.1 ml of serum is added into 0.4cc of 4% ammonium oxalate, dialyzable calcium only is deposited, in calcium oxalate, and nondialyzable one remains without being combined with ammonium oxalate.).

(3) But the mechanism of the separation differs entirely from that of Mr. Yanagisawa's; sucking filtration is carried out, using the special filter, 3 minutes after adding serum into the oxalate solution. The sucking filtration can be finished within 2 minutes.

(4) The filter consists of glass filter (No. 3) and a small amount of asbestos filter, which is sufficiently evenly, pressed to less than 0.5 mm in thickness, laid on the former.

(5) The calcium oxalate which is derived from a part of the filtered nondialyzable calcium and is deposited in the filtrate as well as the rest of the nondialyzable calcium consumes quantitatively E. D. T. A. solution.

(6) The extent of error of this method is within ( $\pm$ ) 5%, as compared with the result gained by the Yanagisawa's.

### I, 緒 言

血中カルシウム(以下Caと略す)は蛋白との結合型と透析性Caとの2つの型で存在しているが,私は臨床的にCa代謝の一端について研究を行わんとして,まずCa定量法について検討を加える必要があることを痛感し,これについて検索を行つた結果,いささか

知見をえたのでここに報告する.さて従来のCa定量法の代表的な方法をあげるならば次のとおりである.

1) Kramer & Tisdall 法<sup>1)</sup>, Clark & Collip<sup>2)</sup> 法, Sobel<sup>3)</sup>法, Sendroy<sup>4)</sup>法,

上記諸法はいずれもCaを尿酸塩,あるいは磷酸塩

として沈澱させ、その蓚酸、あるいは蓚酸を間接的に定量するものである。

### 2) Toksoy & Eser<sup>9)</sup>法

透析膜を用いて透析性 Ca を分離定量するものである。

### 3) EDTA 液による比色定量<sup>10)</sup>法

### 4) 柳沢氏<sup>7)</sup>法

光電比色計を使用する方法で柳沢氏によつて完成されたものである。

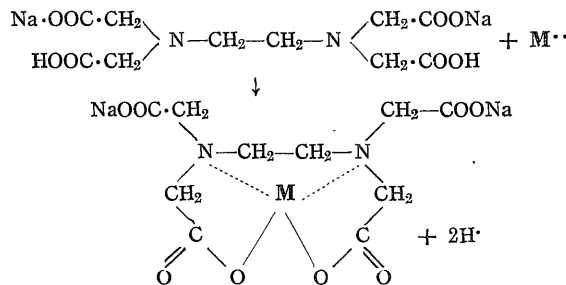
1), 2) 法は長時間を要するうえ操作が複雑で特殊な技術を必要とし、また 3) 法は高価な光電比色計を使用しない利点はあるが、正確度において 4) 法に多少劣るとともに透析性 Ca の定量法がいまだに確立されていないという理由で、柳沢氏法が現今ひろく血

清総 Ca 並びに透析性 Ca の定量法として使用されている。しかし柳沢氏法においては極めて優秀な光電比色計を使用しないかぎりその値は非常に動揺すると同氏は忠告しており、私自身の追試においてもこの点が痛感された。そこで私は光電比色計を設置しない外来または研究室でも比較的簡便にしかも高い正確度をもつて血清総 Ca 並びに透析性 Ca の定量を行いうる方法をみいだすことは意義あることと考えたのでこの点を種々追求した。その結果柳沢氏法の透析性 Ca 測定の原理を利用し、従来透析性 Ca 定量の報告がなかつた EDTA 法に改良を加えることによつて、正確度においても操作の簡易度においても満足してよい定量法を確立しえたと思うので報告する。

## II. 本定量法原理

EDTA-2Na (エチレンジアミンテトラ蓚酸ジナトリウム塩) は水溶液において Ca<sup>++</sup>, あるいは Mg<sup>++</sup> と

定量的に安定な錯塩を生成する。Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> 含有液に EDTA 水溶液を加えると下式にしたがひ



Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> と等量の EDTA が消費されるが、この反応の終点をするために指示薬として、クロールフェノールアゾジオキシナフタリンジスルホン酸ソーダ (Plasmo Corinth B-住友化学製品) なる特殊染料を用いる。本色素はアルカリ性溶液では紫色であるが Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> と定量的に結合して赤色に変化する。しかし Mg<sup>++</sup> は強アルカリ性の液中では Mg(OH)<sub>2</sub> となり呈色に関与しなくなる。そこで血清を強アルカリ性にして Mg<sup>++</sup> を Mg(OH)<sub>2</sub> としたのち Plasmo Corinth B (以下 P. B. と略す) 液を加えると、血清含有液は帯赤紫色を呈するがこれは Ca だけにもとづくものである。この液に EDTA 液を滴下してゆくと、Ca-P. B. の解離度は Ca-EDTA の解離度より大であるから、まず遊離の Ca (血清透析性 Ca) が EDTA に捕捉され、次に血清中の蛋白結合型 Ca からの Ca が遊離して EDTA と結合し、最後に Ca-P. B. として

色素と結合していた Ca も EDTA に結合するため、P. B. は Ca を失つて帯赤紫色から帯青紫色に変化するるのでこれを用いて血清総 Ca 量を測定することができるわけである。ついで透析性 Ca と蛋白結合型 Ca の分離測定法としては柳沢氏<sup>7)</sup>によれば両者が 4% 蓚酸アンモン液と反応結合して蓚酸 Ca となる速さにおいて明確な差を示すのである一定時間後に濾過すれば蓚酸 Ca となる速度のはやい透析性 Ca の方は沈澱として除かれ蓚酸と未反応の蛋白結合型 Ca は濾液中に移行するので濾液に P. B. 液を加えて EDTA 液で滴定すれば蛋白結合型 Ca 量だけが測定される。すなわち蓚酸処理を行わずに滴定して総 Ca 量を測定し、一方蓚酸処理を行つたのち濾過を行いこの濾液を用いて蛋白結合型 Ca 量を測定し、両者の差から透析性 Ca 量がしられるわけである。

### III. 定量法実施について

#### 1) 試薬

a) 0.0005 モル、クロールフェノールアゾジオキシシナフタリンジスルホン酸ソーダ液、住友化学製品 Plasmoco Corinth B を使用する。

本品 0.1298g を 100cc のメスコルベンにいれ、0.1 N-HCl 液を 10cc 加えて再溜水で全量を 100cc とする。(貯蔵液) この貯蔵液 20cc をとり再溜水で全量 100cc となし褐色瓶にいれ暗所に貯蔵する。

#### b) 10 N-NaOH 液

良質の NaOH を油瓶にいれ、これにほぼ同量の再溜水を加えて数日間放置し、この飽和液の上澄 60cc をとり、再溜水で 100cc とする。これを 1N- 蓚酸液で滴定補正する。

#### c) 4N-NaOH 液

#### d) Ca 標準液 (20γ/cc)

純粋な CaCO<sub>3</sub> 0.2497g を正確にとり最少量の稀塩酸に溶解せしめ、温浴中で大部分の液を蒸発せしめたのち、再溜水で 1l とする。この溶液 1cc 中には Ca 100γ を含む。(貯蔵液) この貯蔵液を再溜水で 5 倍に稀釈し、1cc 中に Ca 20γ 含有の液をつくる。

e) 0.001 N- エチレンジアミンテトラ醋酸ジナトリウム塩 (EDTA) 液

EDTA 約 4g を再溜水にとかし全量を 1l とする。この力価は標準 Ca 液をもつて測定し、本液 1cc が Ca 0.4mg に対応するように調節する。(0.02 N-EDTA 貯蔵液)。この液は約 4 カ月の保存にたえる。この貯蔵液を 20 倍に稀釈して用いる。(0.001 N-EDTA 液 1cc=0.02mgCa)

#### f) 4% 蓚酸アンモン液

g) 1% KCN 液 本液は使用しなくてもよい。

#### h) アミールアルコール

#### 2) 器具

a) ミクロビュレット

b) 小試験管イ (1.0×8.0cm) 数本

ロ (1.4×8.0cm) 数本

イ、ロともに無色の良質のものを用い、まえもつてクロム硫酸で処理し、再溜水で洗滌しておく。

c) 0.1cc ミクロピペット

d) 1.0cc ピペット

e) 吸引グロツケ並びに水流ポンプ

f) 白色磁性平板

比色定量のさいミクロビュレットの下方において試験管内の液の変色のぐあいをみやすくするために用いる。従つて平板の両側に白色紙のわくをたてた方がよりぐあいがよくなる。

g) グラスフィルターつき濾斗並びに濾過用石綿 濾斗は 1×2cm の円筒型で内に No. 3 のグラスフィルターの附着したものをを用い、そのフィルター上に毛状の石綿をのせ厚さ約 0.5mm になるように吸引ポンプでひきながらガラス棒で圧縮して二重の濾過膜をつくり濾過に用いる。なおもつとも重要なのは濾過膜の条件で詳細は後述するがおおよそ再溜水を 40 秒前後で濾過するように石綿の厚さ並びに圧縮の度合を調節しておけばよい。また石綿はまえもつて法の如く熱アルカリ並びに硝酸処理したものをさらに EDTA で処理して充分水洗し完全に脱 Ca を行い再溜水で充分洗滌したのち、再溜水中に保存しておく。

#### 3) 実施法

##### A) 血清総 Ca 定量

小試験管イに 4 N-NaOH 液 0.4cc をとり、できるだけ新鮮な血清 0.1cc をミクロピペットで正確にとり 4 N-NaOH 液に加え 2~3 回ピペットの内壁をこの溶液で洗う。次に 1% KCN 液極少量加えてから溶液を振盪混和して約 10 分間放置後、再溜水 (人血清のときは 0.5cc、家兎血清のときは 0.3cc - 詳細は後述) を加えさらに P. B. 液 0.1cc を加えて混和し一様に帯赤紫色を呈せしめたのち、ミクロビュレットを用いて、0.001 N-EDTA 液で滴定する。液が青味をおびるにつれて EDTA 液の滴下速度をおそくしてゆき、終点近くでは特に 1 滴滴下ごとに約 10~20 秒間混和放置して確実に帯青紫色の終末点にいたつたときの EDTA 液の消費量をよむ。(Acc とする)

(註) 終末点に達したか否かを可及的正確に判定するために次の 2 点の操作を行う必要がある。

i) 徐々に EDTA 液を滴下して終末点に達したと思つたらそのときの目盛をよんでおいたうえて、念のためさらに 1~2 滴を滴下してそれ以上変色しないか否かを確かめること。

ii) 検液のみでは変色の判定が困難なのでまえもつて同じ検液で予備試験を行い、終末点と思われる点からさらに 2~3 滴余分に EDTA 液を滴下して確にこれ以上変色しないことをみきわめた予備試験液を準備しておけば、P. B. 液を加えてから 20 分以内に用いる

かぎり終末点の見本となりうるので本試験液の変色のぐあいを常に予備試験液のそれと対比しながら滴定を行うこと。

#### B) 蛋白結合型 Ca 定量

小試験管イに 1% KCN 液 1 滴 (極少量) 並びに 4% 蔞酸アンモン液 0.4cc をとり、これに血清 0.1cc を正確に加えて直に泡だつまで十分に液を振盪混和する。血清を加えてから 2 分 30 秒後石綿をのせたガラスフィルターを用いて吸引濾過する。なお濾過時の受器にあらかじめ 10 N-NaOH 液 0.3cc を入れた小試験管口を用いる。小試験管口の管壁に残つた血清を毎回 0.5cc あでの再溜水を用いて洗滌、濾過操作を 3 回くりかえして完全に小試験管口にうつす。なお第 1 回目の水洗時にさいし、まをもつて小試験管イにアミールアルコール極少量加えて振盪混和すれば血清の泡沫が管底に残留するのを防止できる。かくて計 4 回の全濾過が終了したら小試験管口をとりだして充分振盪混和し約 5 分間放置し、P. B. 液 0.2cc 加えて混和し液が一樣に帯赤紫色を呈したのち、EDTA 液で滴定しその消費量をよむ。(Bcc とする)

(註) このさい次の 4 点に注意する。

i) アミールアルコール極少量とはガラス毛細管からの 1 滴で充分である。

ii) 血清溶液を吸引濾過するとき、あまり吸引がつかずすぎると受器中の液の泡だちがはげしく器外にもれることがあるため多少なりとも泡だちの傾向がみえたらそのつどグロッケに接するゴム管を少しゆるめて減圧の程度を低くすること。

iii) 前述した濾過膜の条件であれば血清液の全濾過に要する時間は 2 分 30 秒以内で完了する。1 検液の濾過が終つたら石綿をとりだしてすて、濾斗並びにガラスフィルターを温浴中に加熱したクロム硫酸液中に充分浸したのち水及び再溜水を吸引しながら十分に洗滌し、新たな石綿をつめかえてさらに再溜水で 2~3 回洗滌して次回の用に供する。

iv) EDTA 液で滴定のときは総 Ca 定量時と同様

に対比用の検液を用いる。しかし対比用液としては B) 法と同じく処理した液でもよいが濾過の手数を省くためには次の液を準備した方がよい。すなわち小試験管口に血清 0.05cc と 4% 蔞酸アンモン液 0.4cc, 1% KCN 液 1 滴, 再溜水 1.5cc 及び 10 N-NaOH 液 0.3cc を加えた液をつくり、これに P. B. 液 0.2cc を加えて EDTA 液を終末点から 2~3 滴余分に滴下した液を用いる。(P. B. 液を加えてから 30 分前後なら充分に対比用として用いられる)

#### c) EDTA 液力価測定

小試験管イに標準 Ca 液 (20γ/cc) 0.5cc と 4 N-NaOH 液 0.4cc をとり、さらに P. B. 液 0.1cc を加えて EDTA 液を滴下する。EDTA 液消費量が Ccc であるとき次項で述べるブランク値 α をさしひいて  $F = \frac{0.5}{C-\alpha}$  として求められる。

(註) 同じ条件で対比液をあらかじめ作成しておく。

#### D) ブランク値における EDTA 液消費量の測定

1) 再溜水 1.0cc, 4 N-NaOH 液 0.4cc, P. B. 液 0.1cc の混液について EDTA 液の消費量を測定する。(α)

EDTA 液の力価が 1~0.95 のときは 0.03cc の値を示す。

2) 再溜水 1.9cc, 4% 蔞酸アンモン液 0.4cc, 10 N-NaOH 液 0.3cc, P. B. 液 0.2cc の混液に対する EDTA 液の消費量を測定する。(β)

EDTA 液の力価が 1~0.95 のときは 0.08cc の値を示す。

#### E) 計算法 (mg/dl)

1) 血清総 Ca 量 =  $0.02 \times 1000 \times (A-\alpha) \times F$

2) 血清蛋白結合型 Ca 量 =  $0.02 \times 1000 \times (B-\beta) \times F$

3) 血清透析性 Ca 量 = I) - 2)

(註) 上式中 0.02 とは 0.001 N-EDTA 液 1cc 中の Ca 対応量 0.02mg を示す。

## IV. 本定量法考察

### 1) 指示薬並びに検液の液性について

本定量では指示薬に P. B. 液を用い、液性を終末点において約 1 N-NaOH 液相当のアルカリ濃度に保つようにした。

(イ) 指示薬について

EDTA 法では指示薬として従来エリオクロームブラック T (EBT), 時にムレキサイドが用いられている。

EBT は検液の pH を約 10 に保つことにより Ca<sup>++</sup> あるいは Mg<sup>++</sup> 含有時の色 (ブドー酒赤色) → Ca<sup>++</sup> ある

いは  $Mg^{2+}$  非含有時の色 (青色) の変化を示すが、緩衝液として ( $NH_4Cl$  67.5g +  $NH_3OH$  570cc/1aq) を用いて pH を 10 に保たしめて行つた私の実験結果は、検液に緩衝液を 1 滴余分に加えたり、あるいは全量の 1 割以内の水を加えることなどによつて終末点の色が (藍色)  $\longleftrightarrow$  (帯緑青色) の変動を示した。そもそも EDTA 法は滴定による定量であるので最終の液量が個々に変化する性質のものゆえ、多少の液量の変化や pH の変動によつて終末点の色の移動を示す EBT の使用は不適当と思われた。なおそのうへ pH が 10 附近では  $Mg^{2+} \rightarrow Mg(OH)_2$  の反応が不完全で  $Ca^{2+}$  のみの定量に支障をきたす点も EBT の使用を妨げる。

ムレキサイドは pH 12 の液性において (ピンク色)  $\rightarrow$  (紫色) に変化する染料であり、 $Mg^{2+}$  にほとんど感ぜず、 $Ca^{2+}$  に感じやすい性質を利用して  $Ca^{2+}$  のみの定量に用いられるのであるが、終末点が EBT 以上にみあやまりやすい欠点を有する。

P. B. は本来は柳沢氏法に用いられている染料である。これを EDTA 法に用いたところ強アルカリ性でさえあればその間多少の pH のずれにおいても、 $Ca^{2+}$ 、 $Mg^{2+}$  含有時の色 (帯赤紫色)  $\rightarrow$  終末点の色 (帯青紫色) を示して、前 2 者に比して終末点の確認ははるかに容易である。柳沢氏によれば P. B. は強アルカリ性においては不安定で褪色しやすいが、20 分以内ならば透過率に変化を認めないと報告しているし、実際に肉眼上では 40 分後においてもほとんど変化を認めない。最近北村氏<sup>9)</sup>なども EDTA 液を滴定液とし、P. B. を指示薬として血清総 Ca 定量法を発表しているが同氏の方法は試料を 0.5cc、約 1/15 N-NaOH 液相当のアルカリ濃度を条件としている点が本法とことなる点である。

#### ロ) 検液の液性について

検液の液性については検液を強アルカリ性に保つほど、P. B. の安定性が低くなる反面、 $Mg^{2+} \rightarrow Mg(OH)_2$  なる反応の速度の迅速さと確実さが増加するという相反する様相が生じてくる。これに対して柳沢氏法では 0.5 N-NaOH 液に相当する液性では  $Mg^{2+} \rightarrow Mg(OH)_2$  の反応に多少不完全さを認め、0.1 N-NaOH 液相当の液性では著しい影響を及ぼして  $Mg^{2+}$  量の一部分が  $Ca^{2+}$  量として誤算されるので、1 N-NaOH 液相当の液性 (全量 5cc 中に 2 N-NaOH 液 2.5cc を加えている) になるように処理されている。従つて本法でも可及的に検液の液性が 1 N-NaOH 液相当のアルカリ濃度を保つように考慮した。すなわち総 Ca 定量におい

ては、はじめ血清 0.1cc に対して 4 N-NaOH 液 0.4cc を加えて  $Mg^{2+} \rightarrow Mg(OH)_2$  の反応を有利ならしめたのち、5~10 分後に再溜水 0.5cc、P. B. 0.1cc 及び EDTA 液の平均消費量 (人血清のとき) 0.5cc を加えることにより終末点において全液量 1.6cc に対して 4 N-NaOH 液 0.4cc となり、液性は 1.0 N-NaOH 液相当のアルカリ濃度を示すことになる。また家兎血清のときは EDTA 液の平均消費量が 0.6~0.7cc となるので、あらかじめ加える再溜水量を 0.3cc に加減することにより同様に 1 N-NaOH 液附近のアルカリ濃度に保ちうる。

結合型 Ca 定量のときは濾過過程の洗滌用に再溜水を 1.5cc 用いる関係上、全体の液量の増加はさけられないので、血清 0.1cc、4% 蔞酸アンモン液 0.4cc、再溜水 1.5cc の合計 2.0cc に対して 10 N-NaOH 液 0.3cc 加えることにより、全体として 1.3 N-NaOH 液相当のアルカリ濃度で  $Mg^{2+}$  を処理し、次に P. B. 液 0.2cc 及び EDTA 液の平均消費量 0.3~0.4cc が加わることにより全量 2.8~2.9cc に対して 10 N-NaOH 液 0.3cc となつて約 1.05 N-NaOH 液相当の液性とすることができる。なお以上の諸点から明白なように全体の液性の度合はほとんど EDTA 液の消費量に左右されてくる。従つて実際に定量を行うさい、常にほとんど 1 N-NaOH 液相当の液性を示すとはかぎらない。この点が本定量法の一つの欠点であるが、しかし同一検体について少なくとも 3~4 回測定可能な検体量が入手できるならばこの欠点は次のようにして補いうる。ちなわちはじめの 1~2 回の予備試験においておおよその EDTA 液消費量をしりえたならば次の式からまをもつて加える水量を加減することによりほぼ正確に最終液性を 1.0 N-NaOH 液相当の pH に保ちうる。

#### (i) 総 Ca 定量の場合

$$1.6 - (E + 0.6) = Xcc$$

#### (ii) 透析性 Ca 定量の場合

$$3.0 - (E + 2.5) = Xcc$$

X : まえもつて加える水量

E : EDTA 液消費量

まず総 Ca 定量の場合について考察するならば、全反応過程に加えられる血清並びに試薬の量は次のようになる。

$$\begin{array}{ccccccc} \text{血清} + 4 \text{ N-NaOH 液} + \text{P. B. 液} + \text{再溜水} + \text{EDTA} & & & & & & \\ (0.1) & (0.4) & (0.1) & (X) & (E) & & \\ & & & & = 0.6 + (X) + (E)cc & & \end{array}$$

次に 4 N-NaOH 液 0.4cc を 1 N-NaOH 液に換算すると 1.6cc に相当する。ゆえに全液量 1.6cc 中に 4 N-NaOH 液 0.4cc 含まれるとすればこの液性は 1 N-NaOH 液に相当することになる。従つて  $0.6 + (X) + (E) = 1.6cc$  となるように (X) 量を調節すれば正確に最終液性を 1 N-NaOH 液に相当せしめることができる。

次に透析性 Ca の場合は 10 N-NaOH 液 0.3cc は 1 N-NaOH 液 3.0cc に相当することから (ii) 式がえられるわけである。

### 2) 妨害物質について

Fe, Cu, Mn, Al, Co, Ni, Be, などのイオンが共存するときは終点の色が不明瞭になつたり、または全く変色がおこらない、しかし血清に含まれるごとき量ではほとんど問題にする必要がないといわれている。さて上記妨害物質除去の目的に常法として 1% KCN 液極少量加えて 40°~50°C, 10分間の処理が行われているが本定量法では特に結合型 Ca の定量において熱処理は不適当と思われるし、表 I のように KCN 液処理のものと無処理のものとの間に EDTA 液消費量の差異を認めなかつたので、特別に KCN 処理の必要がないわけであるが、まれに溶血したときのことを考慮し、正確を期するため 1% KCN 液極少量を加えておくことにした。なお極準 Ca 液を用いての測定において、1% KCN 液添加が本定量の値に何らの影響をおよぼさないことがわかつた。(表 II 参照)

表 I 血清に 1% KCN 液 1 滴加え 40°C, 10分間処理後のものと無処理のものとの総 Ca 量の比較

血 清		KCN 液処理の有無	EDTA 液消費量 cc
人	A 0.1cc	有	0.45
		無	0.45
	B 0.1cc	有	0.50
		無	0.50
家 兔	A 0.1cc	有	0.63
		無	0.63
	B 0.1cc	有	0.61
		無	0.61

(註) 各 5 回測定平均値  
小数点以下 3 位 4 捨 5 入

3) Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> 並びに P. B. 液に対する EDTA 液消費量の量的関係について

表 II 標準 Ca 液に 1% KCN 液を加えたものと、加えないもの(熱処理はせず)の EDTA 液消費量との比較

標準 Ca 液 20γ/cc	1% KCN 液 添加	EDTA 液消費量
0.5cc	1 滴	0.55cc
	なし	0.55cc

(註) 各 10 回測定平均値  
小数点 3 位以下 4 捨 5 入

Ca<sup>++</sup>, Mg<sup>++</sup> の一定量に対して P. B. 液を指示薬としたとき EDTA 液が定量的に消費されるや否やを検討するために次の実験を行つた。

検液 0.5cc に 4 N-NaOH 液 0.4cc を加え 10 分間放置後、P. B. 液 0.1cc を加えて EDTA 液で滴定する。(表 III 参照)

表 III

Ca <sup>++</sup> (20γ/cc)	Mg <sup>++</sup> (10γ/cc)	Aq	EDTA 液消費量
0.5cc	0	0	0.55cc
0.4	0.1	0	0.44
0.3	0.2	0	0.34
0.2	0.3	0	0.24

表 III の如く上記アルカリ濃度においては Mg<sup>++</sup> は EDTA 液消費に関与していないことがわかる。

次に (IV 参照)

a) 各 Ca 含有液についてその EDTA 液

消費量の平均値は理論上からえた値から作成したグラフの直線と全く平行でありその差はグラフ 1 が示すように 0.03cc である。

b) ブランク液においてみると

(イ) 総 Ca 定量法に従つて処理すると常に P. B. 液 0.1cc に対して EDTA 液を 0.03cc 消費する。(ただし EDTA の力価が 0.96 のとき) ゆえに前記の 2 直線の差は P. B. 液 0.1cc による EDTA 液の消費量であることがわかる。

(ロ) 結合型 Ca 定量法に従つて処理すると(尿酸アンモン液含有時)表 IV が示すように P. B. 液 0.1cc に対しては 0.04cc, P. B. 液 0.2cc に対しては 0.08cc の EDTA 液を消費する。ただし EDTA 力価が 0.96 のときである。

なお本法では結合型 Ca 定量時には液量が多く P. B.

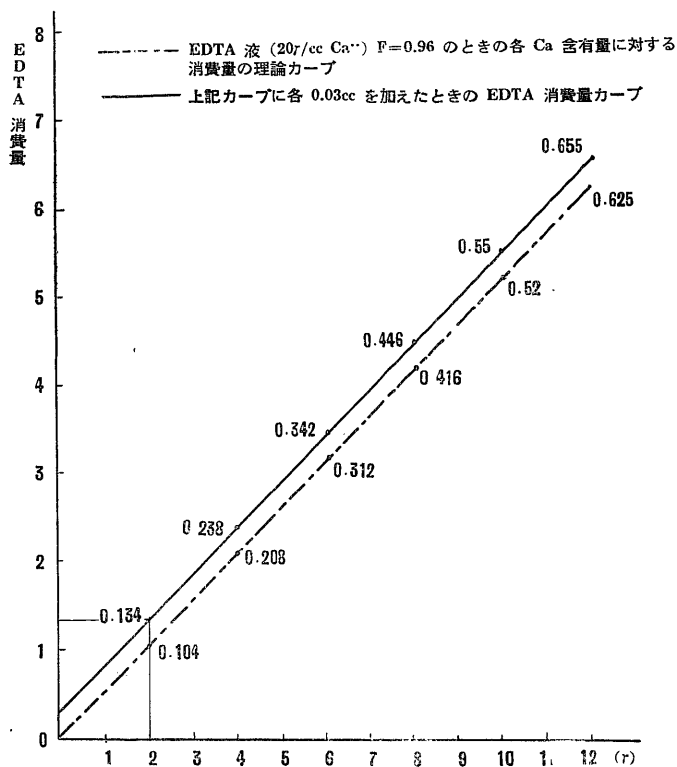


表 IV

Ca <sup>++</sup> 含有量(%)	検液中の各試薬の量とその種類	Ca標準液(40γ/cc)	Ca標準液(20γ/cc)	4% 碳酸アンモン液	10.N 苛性ソーダ液	4.N 苛性ソーダ液	再溜水	プラスB液、コリン	終末点の検液全量	E.D.T.A 消費量 cc	実測値(いたもの)を値をひ	理論値
14	0.35					0.425		0.1	1.62~1.64	0.75~0.77	0.72~0.74	0.73
12	0.3					0.4	0.1	0.1	1.55~1.56	0.65~0.66	0.62~0.63	0.625
10			0.5			0.4		0.1	1.55	0.55 (10回平均値)	0.52	0.52
8			0.4			0.4	0.2	0.1	1.54~1.55	0.44~0.45	0.41~0.42	0.416
6			0.3			0.4	0.4	0.1	1.53~1.54	0.32~0.45	0.29~0.31	0.312
4			0.2			0.4	0.6	0.1	1.53~1.54	0.23~0.24	0.20~0.21	0.208
2			0.1			0.4	0.8	0.1	1.53~1.54	0.13~0.14	0.10~0.11	0.104
0						0.4	1.0	0.1	1.53	0.03 (10回平均値)	0	
0				0.4	0.3		2.0	0.1	2.84	0.04		
0				0.4	0.3		1.9	0.2	2.88	0.08		

(註) 表中 EDTA 消費量はいずれも小数点以下第3位4捨5入したもの

液 0.2cc の方が終末点の色がみやすいので 0.2cc を用いた。

3) 本定量法の誤差  
終末点にいたる色の变化を肉眼で判定する関係上、

EDTA 液消費量において 0.01cc, すなわち  $\text{Ca}^{++}$  量に換算して 0.2 $\gamma$  の誤差を生ずる可能性はさげられないものと思う。しかし本定量法で対照となる血清のい

ずれの検査種目もおおよそ 5 $\gamma$ ~12 $\gamma$ /0.1cc の  $\text{Ca}$  含有ゆえ最大誤差 5%以内にとどめうる事が表Vから示される。

表V 本定量法の誤差

本定量法で対照となる検査種目	各場合における検体中に含まれた平均 $\text{Ca}^{++}$ 量	誤差値 0.2 $\gamma$ のとき全体の $\text{Ca}^{++}$ 量に対する誤差の百分率
	1 $\gamma$ /0.1cc	20%
ヒト血清結合 $\text{Ca}$ 定量	5 $\gamma$ /0.1cc	4.0%
ヒト血清総 $\text{Ca}$ 定量	8 $\gamma$ /0.1cc	2.5%
ウサギ血清結合 $\text{Ca}$ "		
ウサギ血清総 $\text{Ca}$ "	12 $\gamma$ /0.1cc	1.7%
標準 $\text{Ca}$ 液力価 "	10 $\gamma$ /0.1cc	2.0%

#### 4) 血清透析性 $\text{Ca}$ と結合型 $\text{Ca}$ の分離

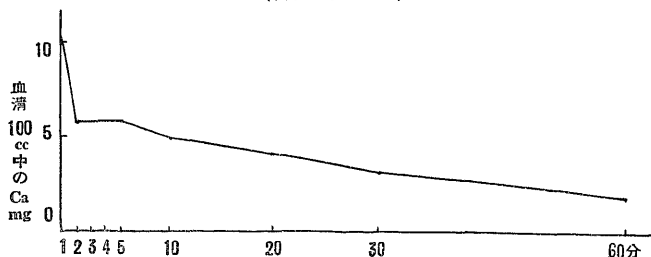
この原理は柳沢氏法のそれによつた。

(イ) 血清 2cc に 4% 蔞酸アンモン液 8cc を加える。その混液 0.5cc に蔞酸アンモン液を加えてから

1分, 2分, 3分, 5分後と時間的経過をたどつて P. B. 液 2cc, 2 N-NaOH 液 2.5cc を加えて定量を行つた結果下図のような曲線をえた。

すなわち 4% 蔞酸アンモン液を加えて 1~5 分間に

(4% 蔞酸アンモン液処理後の血清  $\text{Ca}$  量の時間的経過)  
(柳沢氏による)

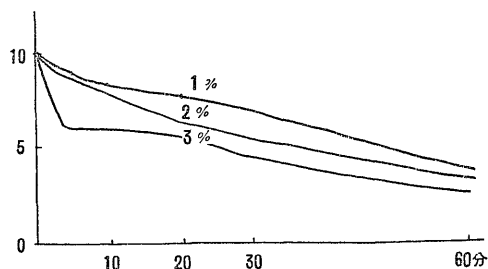


血清  $\text{Ca}$  の約半量が沈澱し、その間はほとんど一定の数値を示すが、そのご時間の経過とともに次第に沈澱が増加する。この 1~5 分間は透析性  $\text{Ca}$  の蔞酸との結合期間で、5分以上は蛋白と結合している  $\text{Ca}$  が蔞酸と結合する期間で両者の間には時間的ずれがあると解されている。なお標準  $\text{Ca}$  液 0.1cc をとりこれに 4% 蔞酸アンモン液 0.5cc を加えて混和し、直ちに P. B. 液を加えると 2分後には盲検液と同じ透過率を示して、 $\text{Ca}^{++}$  は瞬間的に蔞酸アンモンと結合することを示している。

(ロ) 次に蔞酸アンモン液の濃度を 1%, 2%, 3%, 4% とかえて実験した結果は下図の如くで 4% のときが最も明確な段階を示している。

上記 (イ) (ロ) の結果から、柳沢氏法では 4% 蔞酸アンモン液 0.4cc を血清 0.1cc に加えて 3分後に

(濃度別蔞酸アンモン液で処理した血清  $\text{Ca}$  量の時間的経過)  
(柳沢氏による)



P. B. 液 2cc と 2 N-NaOH 液 2.5cc を加えてさらに 3分後に透過率を測定している。そこで本法でも同様に 4% 蔞酸アンモン液 0.4cc に血清 0.1cc を加えて 2分30秒を一応の分岐点として次の操作にうつること



ととした。

#### 5) 蓚酸 Ca の EDTA に対する態度

柳沢氏法では  $\text{Ca}^{++}$  が蓚酸 Ca に変化すると、もはや P. B. の発色に関与しないとの原理にもとづいているため、血清を蓚酸アンモンで処理して3分後に P. B. を加えることにより、蓚酸 Ca となっていない結合型 Ca のみが P. B. の発色に関与して、結合型 Ca のみの定量が可能となるわけであるが、本法においてはさらにそのうえ EDTA が関与してくるので、蓚酸 Ca となつた Ca が EDTA に結合して EDTA の消費量を増加させるや否やを検討する必要が生じた。そこで次の実験を行つた。すなわち標準 Ca 液 (20 $\gamma$ /cc) 0.5cc を滴定すると EDTA 液 0.5cc を消費したのに対し、同じ標準 Ca 液 0.5cc に4%蓚酸アンモン液 0.4cc を加えて24時間放置後、P. B. 液 0.1cc を加えて EDTA 液を滴下すると、はじめの 0.1cc 附近で(帯赤紫色)→(帯青紫色)に近い変色を示すが、振盪しつつ20~30秒経過すると次第に帯赤紫色にもどる。さらに EDTA 液を滴下してゆくと同様な変化をくりかえしつつ遂に 0.55cc を消費して帯青紫色の終末点の色を呈し、それ以上の変色を示さなくなる。血清についての実験においても4%蓚酸アンモン液処理後24時間放置したものと無処理のものとの EDTA 液消費量は全く同一量を示した。従つて EDTA 液は本法の如き条件で生成された蓚酸 Ca から  $\text{Ca}^{++}$  を捕捉結合し、定量的に消費されることがわかつた。

本法の実施においては生成された蓚酸 Ca の沈澱を一定時間後に除去しなければ、透析性 Ca と結合型 Ca の分離定量は不可能だという結論に達した。

#### 6) 蓚酸 Ca の除去

血清に4%蓚酸アンモン液を加えてから約5分以内の短時間に透析性 Ca と結合型 Ca が分離されるので遠心操作では長時間を要し、この場合不適当なるゆえ本法では吸引濾過操作によつて分離する方法をとつた。この場合蓚酸 Ca の沈澱は非常に微細でありかつ微量である。しかも濾過中余分の  $\text{Ca}^{++}$  混入はゆるされないので、まゑもつて温浴中にしたしてあるクロム硫酸で処理し十分に水洗したグラスフィルター上に、アルカリ及び酸処理しさらに EDTA 液によつて完全に脱 Ca したのち十分に水洗した濾過用石綿を厚さ 0.5mm 前後に圧縮してのせた。洗滌操作は血清液濾過後毎回 0.5cc あての再溜水で3回、小試験管を洗いその液をそのつど吸引濾過しながら濾過膜に附着している血清を洗いおとすことにした。

(イ) 標準 Ca 液 (20 $\gamma$ /cc) 0.5cc を前記濾過膜で吸引濾過し、再溜水 0.5cc あて3回の洗滌後、P. B. 液 0.2cc 並びに 10 N-NaOH 液 0.3cc を加えて EDTA 液滴下の消費量を検したところ 0.60cc (各5回平均値、小数点3位以下4捨5入)であつた。つぎに標準 Ca 液 0.5cc、再溜水 1.5cc 並びに P. B. 液 0.2cc、10 N-NaOH 液 0.3cc の混和に対する EDTA 液消費量は同様に 0.60cc を示した。すなわち  $\text{Ca}^{++}$  は全量ことごとく濾過されたことを示している。

(ロ) 標準 Ca 液 (20 $\gamma$ /cc) 0.5cc に4%蓚酸アンモン液 0.4cc を加えて振盪し24時間放置後、実験(イ)と同条件で吸引濾過後、P. B. 液 0.2cc、10 N-NaOH 液 0.3cc を加えて EDTA 液滴下の消費量を検するに 0.11cc (5回平均値)をえた。この実験では EDTA 液消費量は0になつていないがこれは前述した如く、0.11cc 中 0.08cc は P. B. 液 0.2cc に対して常に消費される量であつて 0.03cc のみが問題になる。今の場合 EDTA 液 0.03cc は  $\text{Ca}^{++}$  量約 0.6 $\gamma$  で試料中の全  $\text{Ca}^{++}$  量の約6%に相当する。

(ハ) 血清 0.1cc、再溜水 1.9cc、10 N-NaOH 液 0.3cc 並びに P. B. 液 0.2cc に対する EDTA 液消費量は 0.86cc であつた。すなわち実質上の EDTA 液消費量は 0.78cc となる。次に同じ血清 0.1cc に再溜水 0.4cc を加えて吸引濾過し、再溜水 1.5cc で3回洗滌したのち 10 N-NaOH 液 0.3cc 並びに P. B. 液 0.2cc を加えたものに対する EDTA 液消費量をみるに同様に 0.86cc を示した。

(ニ) 実験(ハ)と同一な血清 0.1cc に4%蓚酸アンモン液 0.4cc を加えて24時間放置したのち吸引濾過を行い、再溜水 1.5cc で3回洗滌し、10 N-NaOH 液 0.3cc 並びに P. B. 液 0.2cc 加へ EDTA 消費量をよむに 0.13cc を示した。従つて実質上の EDTA 液消費量は 0.05cc となり全消費量の約6%に相当する。

さて一般に蓚酸 Ca は水 100cc に対して 13°C においては 0.00067g 溶解する。従つて  $\text{Ca}^{++}$  を蓚酸 Ca として沈澱させる方法では 13°C で 4.2%の誤差を生ずるわけである。さらに 13°C 以上では誤差値が蓚酸 Ca の溶解度上昇のため 4.2%以上となりうるわけである。従つて本実験(ロ)(ニ)が示した約6%の  $\text{Ca}^{++}$  量の濾液混入の事実は大部分が蓚酸 Ca の溶解の結果によるものであり、濾過膜の欠陥による蓚酸 Ca の逸脱と考える必要はないと思われる。

7) 蓚酸 Ca の生成過程に与えた時間並びに濾過操

## 作に要する時間

前記グラフ(4)の項参照)に従つて4%酢酸アンモン液を加えてから5分以内に透析性Caと結合型Caの分離を終了するのが理想であるが、本法においても血清液濾過の全段階に2分30秒以内を要し、従つて酢酸アンモン液を加えてから2分30秒後に濾過を開始するので最高計5分間で濾過操作を完了することになり合目的である。

## 8) 濾過膜の条件

本透析性Ca定量において濾過膜の性状が最も重要な役割をめている。すなわち石綿の厚さが厚すぎると血清が石綿に吸着されCa<sup>++</sup>の濾過が不十分となり、反対にうすすぎると酢酸Caの沈澱が石綿層を通過し

て濾液中に混入するおそれがある。従つて定量にさきだちまず濾過膜の調整を充分に行つておく必要がある。私は前記のようにNo.3のグラスフィルターを用い石綿の厚さを0.5mm前後にし何度も水を吸引しながらガラス棒で平等に充分な圧迫を加えて2ccの水を約40秒で吸引濾過するよう調整したところ6)実験(イ)(ロ)(ハ)(ニ)において満足してよい条件をうるようになった。もし初回において20~30秒の濾過時間を示すときでもさらに石綿を加えることを試みるまえに、さらに充分な水の吸引と同時に圧迫をくりかえすことを試みるならば往々にして濾過時間の延長を示すゆえ石綿の追加は軽々しく行わない方がよい。

## V. 本定量法吟味

現在血清総Ca並びに結合型Ca測定はもつぱら柳沢氏法に重点がおかれているので私は本定量法による測定値の吟味は柳沢氏法の値と対比することにした。

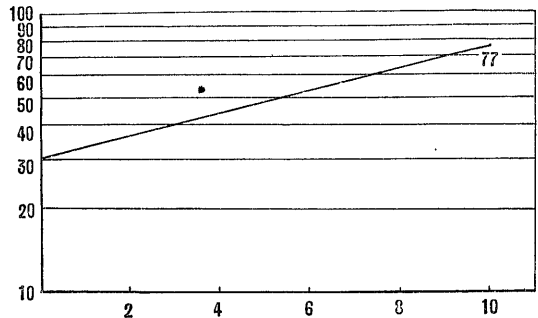
## 1) 柳沢氏法

従来柳沢氏法では標準グラフが直線にならないとか、作成が困難だとかいわれているが同氏自身も特にフィルターが不正確な光電比色計では感度が鈍いゆえ、正確な測定には良質のものを使用すべきだと注意している。私は日立製作所製、EPU-2型光電光度計の使用の便宜を与えられたので柳沢氏法を追試したところ、極めて良好な結果をうることができたので以後その値を本定量法の値と対比することにした。

## 2) 柳沢氏法と本法との測定値の対比

柳沢氏法実施にあつて日立製、EPU-2型光電光

グラフ II



度計使用、スリット幅0.15、波長20mm、プランクを30%にあわせて測定した。なお標準グラフはグラフIIのような直線を示した。

表VI 柳沢氏法と本法との対比

検液種類	総 Ca mg/dl			蛋白結合型 Ca mg/dl		
	柳沢氏法	本 法	誤 差	柳沢氏法	本 法	誤 差
Liquor I	4.9	4.9	0%			
" II	4.6	4.5	- 2.2			
Serum I	9.0	8.7	- 3.3	5.9	6.1	+ 3.4
" II	8.8	9.0	+ 2.3	7.4	7.6	+ 2.7
" III	9.0	9.2	+ 2.2	7.5	7.3	- 2.6
" IV	10.0	10.2	+ 2.0	6.4	6.1	- 4.7
" V	9.3	9.1	- 2.1	6.3	6.5	+ 3.1
" VI	8.5	8.4	- 1.2	5.5	5.25	- 4.5

5回平均値、誤差範囲は±に及ぶ

(註) 誤差範囲は(+) (-)両方に及んでいる。血清(人)総Ca量においては柳沢氏法に比して最大誤差は3.3%を示した。血清(人)結合型Ca量においては柳沢氏法に比して最大誤差は4.7%を示している。

## VI. 要 約

本定量法を要約すると次のようになる。

- 1) P. B. 液を指示薬として EDTA 液による適定によつて血清総 Ca 並びに結合型 Ca 量を測定した。
- 2) 血清中の透析性 Ca と結合型 Ca の分離は柳沢氏法の分離の原理を応用して 4% 蔞酸アンモン液を検液の 4 倍量加え、2 分 30 秒後に濾過操作を開始して 5 分以内に濾過分離されるようにした。
- 3) プランクにおいて P. B. 液はその量的関係、検液中の試薬の種類によつて一定量の EDTA 液を消費するから、常に滴定値から P. B. に対して消費した EDTA 液の一定量をさしひいて換算する必要がある。
- 4) 結合型 Ca と透析性 Ca の分離のために生成された蔞酸 Ca は EDTA 液を消費するので定量に不要な Ca<sup>++</sup> に対応する蔞酸 Ca, すなわち透析性 Ca から

生成された蔞酸 Ca は除去の必要があり、本定量法では吸引濾過により濾別することにした。

- 5) P. B. 液を指示薬としたときも Ca<sup>++</sup> 含有量に比例して定量的に EDTA 液が消費される。
- 6) 指示薬として P. B, EBT. ムレキサイドのうち強アルカリ性液中では終末点の変色もつともみやすい利点がある P. B. をえらんだ。
- 7) 本定量法では終末点の P. B. の変色の判定に関して、EDTA 液消費量 0.01cc (Ca<sup>++</sup> 0.2γ に相当) のよみの誤差がある。
- 8) 本定量法と柳沢氏法との比較については 8 例中、人血清総 Ca 量では最大 3.3%, 人血清結合型 Ca 量では最大 4.7% の誤差の範囲内にあり、従つて充分に代用することができる。

## VII. 結 論

- 1) 従来の EDTA 法では血清結合型 Ca と透析性 Ca の分離定量の報告がなかつたが本定量法により可能となつた。
- 2) 柳沢氏法と対比してその操作の習熟、並びに所要時間について多少劣ることを認めざるをえないが、優秀な光電計を使用しないで血清中の Ca<sup>++</sup> 動勢を検

討することが可能であることに大きな意義をもつと考へる。

稿を終るにのぞみ御指導と御校閲を賜つた恩師松田教授に深く感謝するとともに、実験上多大の御教導を賜つた本学薬学部生化学教授山本謙博士に謝意を表します。なお光電比色計使用に多大の御援助をいただいた本学理学部無機化学教室久野栄進氏に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Kramer, B. & Tisdall, F. F. : J. Biol. Chem., 48, 223 (1921).
- 2) Clark, E. P. & Collip, J. B. : J. Biol. Chem., 63, 461 (1925).
- 3) Sobel, A. E. & Sklesky, S. : J. Biol. Chem., 122, 665 (1938).
- 4) Sendroy J. Jr. : J. Biol. Chem., 144, 243 (1942).
- 5) Toksoy, G. & Eser, S. : Helvet. Med. Acta., (Supp. 7) 8, 77 (1941).
- 6) (イ) Schwarzenbach & Ackermann : Helv. Chim. Acta., 31, 1029 (1948). (ロ) Bjederman. & Schwarzenbach : Chimia., 2, 56 (1948). (ハ) Bety. Noll : J. Am. Waterworks Assoc., 22, 798 (1950). (ニ) Goetz, Loomis, Diehl : Amal. Chem., 22, 798 (1950). (ホ) Diehl, Goetz-Hach. : J. Am. Waterworks Assoc., 42, 40 (1950). (ヘ)

- Albert. M. Mattocks, Hector R. Hernandez : J. Am. Pharm. Assoc., 39, 519 (1950). (ト) 上野 : 化学の領域, 5 No. 8 P. 57 (昭26).
- (チ) 石井 : 医学と生物学, 24 No. 19.
- 7) (イ) 柳沢 : カルシウム及びマグネシウム新定量法と代謝, (文光堂). (ロ) 柳沢 : 新潟医学会雑誌, 65, 11, 761 (1951). (ハ) 柳沢 : 新潟医学会雑誌, 65, 12, 838 (1951).
- (ニ) 柳沢 : 新潟医学会雑誌, 66, 2, 90 (1952).
- (ホ) 柳沢 : 新潟医学会雑誌, 66, 5, 302 (1952).
- (ヘ) 柳沢 : 新潟医学会雑誌, 66, 12, 837 (1952).
- (ト) 柳沢 : 新潟医学会雑誌, 66, 12, 843 (1952).
- (チ) 柳沢 : 新潟医学会雑誌, 67, 3, 275 (1953).
- (リ) 柳沢 : 新潟医学会雑誌, 67, 4, 387 (1953).
- (ヌ) 柳沢 : 新潟医学会雑誌, 67, 11, 1061 (1953).
- 8) 北村他 : 臨床病理, 4, 2, 148 (1956).