硫酸銅法による緬羊の血漿蛋白質濃度測定法

三 村 耕

(東京農工大学繊維学部)

Studies on the copper sulfate method applied to the determination
of protein content in plasma taken from sheep

KO MIMURA

(Textile Faculty, Tokyo University of Agriculture and Technology)

PHILLIPS, VAN SLYKE¹⁾等の硫酸銅法を吉川²⁾(1946)が我が国に紹介して以来、同法について多くの追試及び批判が発表されるとともに、その簡易且正確度の高いことが広く認められるに至った。

家畜においては、岡部等³⁾(1951)、伊藤等⁴⁾(1949)三村⁵⁾(1950 & 51)が馬、牛、緬羊その他について、同法によりその全血比重、血漿比重、蛋白質含量その他を發表している。

MOORE & VAN SLYKE⁶⁾(1930)は、血漿比重 G_p 、血漿より蛋白質を除いた液の比重 G_0 、血漿蛋白質濃度 g/dl x とすれば

$$x = C (G_p - G_0) \dots\dots\dots (1)$$

が成立するものとして次の式を提唱した。

$$x = 343 (G_p - 1.007) \dots\dots\dots (2)$$

PHILLIPS 等は硫酸銅法により G_p を測定すれば次の(3)式により蛋白質含量を算出できると発表した。

$$x = 389.6 (G_p - 1.0079) \dots\dots\dots (3)$$

これに対し Zozaya⁷⁾(1935)は MOORE & VAN SLYKE を批判して、血液全蛋白と血液比重との相関は血液全蛋白と血液屈折率との相関0.53より劣り 0.28 ± 0.062 に過ぎないから、比重から蛋白質含量を計算するのは正しくなく、MOORE 等のあやまりは血漿の代りに血清を用いたからであろうと述べている。

然し WEECH 等⁸⁾(1936)は犬血液について比重と血漿蛋白質含量との間には0.9915(164例)、比重と血清蛋白質含量とは0.9937(145例)の強度の相関を認め、(2)式を支持すると共に、Zozaya のいう如く血漿と血清による差は認められないと主張している。

その他、LOONEY⁹⁾(1942)は血清比重と蛋白質濃度との相関は非常に低いとし、ADAMS & BALLOU¹⁰⁾(1946)は数百例について、比重から計算した蛋白質濃度とミクロケルダールによる実測値とのひらきは $\pm 0.2g/dl$ をこえないと報告している。

我が国では、若林・今井¹¹⁾(1946)は硫酸銅法による蛋白質含量の計算値はブルフリツヒ液浸法により REISS の

表を用いた計算値より正確であることを認め、三浦¹²⁾、吉川¹³⁾(1946 & 47)は成年男女について血清比重と蛋白質含量とは略々直線的関係にあるが、

$$x = 377 (G_p - 1.007) \dots\dots\dots (4)$$

を適当とするとなし、平山・門田¹⁴⁾(1951)は血清25例に於いて硫酸銅法による比重とケルダールによる蛋白質含量との相関は0.962で、硫酸銅法は病的血清に於けるアルビュミン・グロビュリン比、ビリルビン、脂質、血糖、残余窒素の増減にも安定であると報告している。

以上の諸氏に反し佐藤¹⁵⁾(1947)、柳沢等¹⁶⁾(1950)は PHILLIPS 等の常数は改訂を要すると主張している。

以上要するに我が国においても、血漿(血清)蛋白質測定法としての硫酸銅法は正確度の高いことが認められるが、尙 PHILLIPS 等の(3)式は改訂を要するとなす声も多い。

家畜についての前記諸氏の批判はまだ發表されていないが、筆者は家畜中特に緬羊の全血比重は $1.0380 \sim 1.0496$ 、血漿比重 $1.0215 \sim 1.0245$ (1951 までの筆者の実験例)は PHILLIPS 等の人血比重 1.0595 ± 0.0017 、同血漿比重 1.0264 ± 0.0009 に比較して著しく低く、従て蛋白質含量は両者の間に大きな差があるものと考えられ、且、Zozaya, LOONEY 等の批判の点からみて

1 家畜の血漿(血清)蛋白質含量を硫酸銅法により測定できるか

を問題にすると共に、前記諸氏の批判からみて

2 PHILLIPS 等の(3)式はそのまま応用できるかの2点について検討の必要を感じた。

ここに1カ年に亘り、正常緬羊の新鮮血25例について実験を行つたのでその結果を發表する。

実験方法

1 附属農場所有の緬羊中、月令3カ月～11カ月の仔羊、8才の牝羊、2才の牡羊等各種の正常緬羊を、1952年6月、7月、10月、1953年1月の各季節に亘り選り採血した。供試緬羊の詳細は第1表の通り。

2 できるだけ晴天の日を選び、予め体温、脈搏、呼吸数を測つて正常状態にあることを確めた後、頸静脈より採血し、一部を以て直に全血比重を測り、別に4ccを遠心沈澱管にとり3千回転30分の遠心分離を行い血漿をえた。凝固阻止剤として HELLER & PAUL²⁾ の2重硫酸塩mg/ccを使用した。

第1表 供試綿羊の詳細

供試番号	(月) 年令	性別	採血年月日	供試番号	(月) 年令	性別	採血年月日
1	3カ月	♀	27.6.10	14	6カ月	♀	27.10.17
2	"	♂	27.6.11	15	4才	♀	27.10.21
3	"	♀	27.6.13	16	2才	♀	27.10.21
4	"	♀	27.6.14	17	2才	♀	27.10.23
5	4カ月	♂	27.6.18	18	2才	♀	28.1.14
6	3カ月	♀	27.7.9	19	2才	♀	28.1.16
7	8才	♀	27.7.16	20	2才	♀	"
8	6才	♀	"	21	4才	♀	28.1.19
9	2才	♀	27.7.18	22	2才	♀	28.1.19
10	2才	♀	"	23	11カ月	♀	28.1.21
11	6カ月	♀	27.10.15	24	"	♀	28.1.22
12	"	♂	27.10.16	25	"	♀	"
13	2才	♂	27.10.17				

註 No.15は発情中、No.19、No.20、No.21は妊娠中

3 血漿比重を硫酸銅法により測定した。この際2重硫酸塩mg/ccは比重0.0004を増加するものとして測定値を補正した。

別に HOWE のミクロケルダール法を用い全窒素及び残余窒素（除蛋白は GREEN-WALD のトリクロール醋酸法による）を測り、これより蛋白質窒素を求めた。蛋白質窒素より蛋白質量をだす係数には、GUILLAUMIN¹⁷⁾、吉川¹³⁾、若林等¹¹⁾等の論じているところに従い6.25の代りに6.55を用いて蛋白質濃度を求めた。

実験結果と考察

1 正常綿羊血液25例の硫酸銅法による血漿比重、及びミクロケルダールによる血漿蛋白質濃度は第2表の通りである。

即ち血漿比重は1.0211~1.0256、平均 1.0227 ± 0.0002 血漿蛋白質濃度は5.3147~7.5744g/dl、平均 5.952 ± 0.1304 g/dlである。

2 血漿比重を横軸に、血漿蛋白質濃度を縦軸にとり第1図の点図表をつくると、両者の間には明に直線的関係が認められる。

両者の間の相関係数 γ_{kc} を求めると

$\gamma_{kc} = +0.792$ となる。念の為その信頼性を検定すると

$$t = \gamma \left\{ \frac{n-2}{1-\gamma^2} \right\}^{\frac{1}{2}} \text{ より } t = 0.6904 > t_{0.01} \text{ で危険率}$$

1%で有意である。即ち ZOZAYA, LOONEY の主張と異なり、WEECH 等の0.9915には及ばないが三浦の0.73より高く満足すべき結果といえることができる。

第2表 血漿比重と蛋白質濃度

供試番号	血漿比重	全窒素 g/dl	残余窒素 g/dl	蛋白質窒素 g/dl	蛋白質濃度 g/dl
1	1.0216	0.9105	0.0574	0.8531	5.5878
2	1.0231	1.0674	0.0573	1.0101	6.6162
3	1.0216	0.9074	0.0598	0.8476	5.5518
4	1.0226	1.0138	0.0573	0.9565	6.2651
5	1.0221	0.9365	0.0470	0.8895	5.8262
6	1.0226	1.0440	0.0612	0.9828	6.4373
7	1.0211	0.8575	0.0461	0.8114	5.3147
8	1.0231	1.0206	0.0478	0.9728	6.3718
9	1.0231	1.0230	0.0320	0.9910	6.4910
10	1.0216	0.8798	0.0389	0.8409	5.5079
11	1.0256	1.1920	0.0433	1.1487	7.5240
12	1.0236	1.0505	0.0242	1.0263	6.7223
13	1.0231	0.9961	0.0267	0.9694	6.3496
14	1.0211	0.8622	0.0355	0.8267	5.4149
15	1.0241	1.1510	0.0262	1.1248	7.3674
16	1.0246	1.1781	0.0217	1.1564	7.5744
17	1.0236	1.0919	0.0345	1.0574	6.9260
18	1.0221	0.9567	0.0587	0.8980	5.8819
19	1.0226	1.0204	0.0462	0.9742	6.3810
20	1.0226	1.0354	0.0431	0.9923	6.4996
21	1.0226	0.9964	0.0562	0.9402	6.1583
22	1.0216	0.9142	0.0580	0.8562	5.6081
23	1.0221	0.9491	0.0606	0.8885	5.8197
24	1.0216	0.8886	0.0480	0.8406	5.5059
25	1.0231	1.0092	0.0549	0.9543	6.2507

点図表1 蛋白質濃度と比重の相関

$$3 \quad x = c (G_p - G_0) \text{ に於て}$$

$$x = y, G_p = x \text{ とおけば}$$

$$y = cx - cG_0$$

$$cG_0 = -a \text{ とおけば}$$

$$y = cx + a$$

これは第1図に於ける回帰直線を示す式であるから、最小自乗法を用い

$$a = \frac{\sum y - c \sum x}{n}$$

$$c = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2} \quad G_0 = -\frac{a}{c}$$

となる。第2表の数値を夫々あてはめると

$$c=400, \quad G_0=1.0071$$

4 かくして求めた関係式

$$x \text{ (g/dl)} = 400 (G_p - 1.0071) \dots\dots\dots (5)$$

より計算した計算値を、ケルダールによる実測値に対し比較すると第3表の通りで、その偏差は平均0.2087g/dlである。危険率5%に於いて偏差の信頼限界は0.2087±0.0856g/dlであつて平均血漿蛋白質濃度に対し最大5%以内、平均3.5%の偏差にすぎない。

5 蛋白質窒素より蛋白質を求める係数6.55の代りに従来通りの6.25を用い、比重と蛋白質濃度から関係式を導き出すとすると、 G_0 はそのまゝとして

$$x \text{ (g/dl)} = 382.5 (G_p - 1.0071) \dots\dots\dots (6)$$

となる。

6 (5)式は(3)式、(4)式に比較して少しく高い値となつているが、今(3)式による計算値を実測値に対し比較すると第3表の通りである。

第3表

実測値に対する計算値の偏差

即ち偏差平均-0.

4877g/dl, 5%

の危険率でその信

頼限界-0.4877±

0.0900g/dlとなり

平均蛋白質濃度に

対し最大9.7%の

偏差となるから、

(5)式による場合

の凡2倍である。

PHILLIPS 等の

$G_0=1.0079$ も亦、

従来の報告に比較

して高く、WEECH

等は犬血漿に於い

て $G_0=1.00687$ と

報告している。

何れにしても

(3)式による計算

値が実測値に比較

供試番号	偏差	実測値に対する 計算値の偏差	
		(5)式	(3)式
1		+0.2122	-0.2503
2		-0.1838	-0.6943
3		+0.2482	-0.2143
4		-0.0651	-0.5380
5		+0.1738	-0.2939
6		-0.2373	-0.7102
7		+0.2853	-0.1722
8		+0.0282	-0.4499
9		-0.0910	-0.5691
10		+0.2921	-0.1704
11		-0.1240	-0.6281
12		-0.1223	-0.6056
13		+0.0504	-0.4277
14		+0.1851	-0.2722
15		-0.5674	-1.0559
16		-0.5744	-1.0681
17		-0.3260	-0.8093
18		+0.1181	-0.3496
19		-0.1810	-0.6539
20		-0.2996	-0.7725
21		+0.0417	-0.4312
22		+0.1919	-0.2706
23		+0.1803	-0.2874
24		+0.2941	-0.1684
25		+0.1493	-0.3288

註(5式: $x=400(G_p-1.0071)$ による計算値

(3)式: $x=489.6(G_p-1.0079)$ による計算値

(5)式による計算値の実測値に対する95%の信頼限界を平山、門田の-1.5±4.7%に比較しても略々満足すべき結果といふことができる。

綜 括

1 綿羊の血漿蛋白質濃度測定法として硫酸銅法を応用できるかどうか、更にこの際 PHILLIPS 等の関係式 $x=389.6 (G_p-1.0079)$ は妥当であるかどうかを検討する為、牝牡、去勢及び年(月)令の別のある正常仔羊及び成綿羊(妊娠羊を含む)の血漿 25 例に就て試験した。

2 血漿比重を硫酸銅法により測定し、他方 HOWE のミクロケルダール法により蛋白質窒素を定量し係数6.55として蛋白質含量を算出した。

血漿比重は平均1.0227±0.0002、血漿蛋白質濃度は平均5.952±0.1304g/dlであつた。

3 蛋白質濃度を縦軸、比重を横軸にとり点図表をつくと、両者の間には略々直線関係が認められ、相関係数を求めると

$$r_{kc}=0.792 \text{ であつた。}$$

4 蛋白質含量と血漿比重の間には。

$x=c (G_p-G_0)$ の関係が認められるから、次の変数変換式から

$$c = \frac{n \sum xy - \sum x \sum y}{n \sum x^2 - (\sum x)^2}, \quad a = \frac{\sum y - c \sum x}{n}, \quad G_0 = -\frac{a}{c}$$

(但し x は血漿比重、 y は蛋白質濃度)

$$c=400$$

$$G_0=1.0071$$

がえられる。

5 $x \text{ g/dl} = 400 (G_p - 1.0071)$ による計算値の実測値に対する偏差は平均0.2087g/dl (95%の信頼限界0.2087±0.0856g/dl) であつて、PHILLIPS 等の関係式によると実測値との偏差は平均 -0.4877g/dl (95%の信頼限界-0.4877±0.0900g/dl) となり前者は正確度に於いて遙に優る。

6 蛋白質窒素に対する蛋白質の係数を6.25とした場合は

$$x \text{ g/dl} = 382.5 (G_p - 1.0071) \text{ を適当とする。}$$

7 以上の結果、綿羊の血漿蛋白質濃度測定法としての硫酸銅法は高い正確度を期待できるが、この際 PHILLIPS 等の関係式を次の如く改訂することを提唱する。

$$x \text{ g/dl} = 400 (G_p - 1.0071) \text{ (1953.4.4. 受付)}$$

文 献

1) PHILLIPS, VAN SLYKE, DOLE, EMERSON, HAMILTON and ARCHIBALD (1943): Bull. U. S. Army Medical Dept. No. 71, 66 (2)より引用

2) 吉川春寿(1946): 医学のあゆみ 1, 1; 3

吉川春寿(1950): 硫酸銅法 第2版, 東京

3) 岡部・三浦・野村・下田・大井・沢崎(1951):

日畜学会講演 昭昭26年5月

- 4) 伊藤秀三郎, 小林所介 (1949): 医学と生物学, 14, (4); 254
- 5) 三村 耕 (1950&51): 日畜学会講演 昭昭25年10月, 昭昭26年5月
- 6) MOORE & VAN SLYKE (1930): J. Clin. Invest. 8, 337 (7)より引用
- 7) J. ZOZAYA (1935): J. Biol. Chem., 110, (3); 599
- 8) A. A. WEECH, E. B. REEVES & E. GOETTSCH (1936): J. Biol. Chem., 113, (1); 167
- 9) LOONEY (1942): J. Lab. Cl. Med., 27, 1463 (2)より引用
- 10) ADAMS & BALLOU (1946): J. Lab. Cl. Med., 31, 507 (2)より引用
- 11) 若林芳夫, 今井 守 (1946): 医学と生物学, 9, (6); 359
- 12) 三浦義彰 (1946): 医学と生物学, 9, (1); 4
- 13) 吉川春寿 (1947): 日新医学, 34, (1); 6
- 14) 平山千里, 門田光二郎 (1951): 日本血液学会雑誌, 14, (4); 59
- 15) 佐藤, 福山, 酒井 (1947): 厚生科学 6, (1~2); 24
- 16) 柳沢文正 (1949): 新潟医学会雑誌, 63年 10号, 676. 柳沢, 山嵜, 水木 (1950): 生体の科学 2, (1); 14
- 17) C. O. GUILLAUMIN et al. (1929): Bull. Soc. Chem. Biol., 11, 387 (11)より引用

Résumé

Since YOSHIKAWA introduced the copper sulfate method for estimating the level of protein in blood plasma in Japan, many papers which confirmed the accuracy of predication based on PHILLIPS' formula. But at the same time other men reported that PHILLIPS' formula would be modified.

Application of the copper sulfate method were studied on blood plasma taken from sheep.

25 samples of plasma taken from sheep were analyzed for both specific gravity and protein content.

Results are as follows:

1 The data were plotted to chart in order to examine the correlation between specific gravity and protein content in sheep blood plasma, and it was observed that high positive correlation seemed to be present.

Statistical analysis shows the following figures.

$$\gamma = +0.792, t = 0.6904 > t_{0.01}, l = 23$$

sp. g. (by copper sulfate method) 1.0227 ± 0.0002
protein content (by HOWE's micro KJELDAHL P = 6,55N) $5.952 \pm 0.1304 \text{g/dl}$

protein content $\text{g/dl} = 400 (G_p - 1.0071)$

G_p : specific gravity of plasma

2 This equation for plasma of sheep which permits the predication of protein content from specific gravity of plasma is different from that of PHILLIPS.

Equation presented in this paper gives satisfactory predications throughout the entire concentration range, but predications from PHILLIPS' formula give great deviations between protein contents.

Statistical analysis are as follows.

a) Deviations between protein contents and predications from the equation presented in this paper.

Mean 0.2087g/dl

Confidence interval $0.2087 \pm 0.0856 \text{g/dl}$

b) Deviations between protein contents and predications from PHILLIPS' formula

Mean -0.4877g/dl

Confidence interval $-0.4877 \pm 0.0900 \text{g/dl}$