Studies on Patterns of the Binding of Androgen with Serum
Protein by the Method of Centrifugal Ultrafiltration (II)
Binding of Dehydroepiandrosterone Sodium Sulfate with Bovine Serum Protein

Hisao ISHIKAWA

Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medicine, Kanazawa University

(Director : Prof. Fumio Akasu)

Studies were carried out for the elucidation of the binding of dehydroepiandrosterone sodium sulfate (DHA-S) with bovine serum protein by the method of centrifugal ultrafiltration. In order to examine the stoichiometric relation among the concentrations of DHA-S, protein, and DHA-S protein complex, two series of experiments were performed.

1) With the constant concentration of protein (3.4 gm/dl), the concentration of DHA-S was varied, i.e., 80, 160, 240, 320, and 400 $\mu\text{g}/\text{cc}$.

2) With the constant concentration of DHA-S (400 $\mu\text{g}/\text{cc}$) the concentration of bovine serum protein was varied, i.e., 1.7, 3.4, 5.1 and 6.1 gm/dl.

These solutions were equilibrated with 5% CO_2 in air for 20 to 30 minutes at 37°C (pH 7.4) and 5cc of the solution was centrifuged for 15 minutes at 3000 r.p.m., the radius of rotation being 15cm. 1cc of ultrafiltrate was acid hydrolyzed and extracted with ether. The colorimetric determination of DHA was carried out according to the method of Zimmermann.

The results were as follows:

1) The concentration of diffusible DHA-S in ultrafiltrate was 13.7, 17.0, 31.5, 44.6, 62.8 $\mu\text{g}/\text{gmH}_2\text{O}$ when the original solution contained DHA-S at the concentration of 80, 160, 240, 320, and 400 $\mu\text{g}/\text{cc}$ respectively with the constant concentration of protein.

2) In this series of experiments the ratio of the amount of the bound DHA-S to the total amount of DHA-S added was 83.5, 89.8, 87.1, 86.6, and 84.9% and there seems to be no significant difference among these values. The amount of bound DHA-S per unit amount of protein was 2.1, 4.4, 6.5, 8.5, and 10.2 mg/gm protein respectively.

3) In the second series of experiments where the protein concentration in the original solution was changed keeping the total concentration of DHA-S constant, the concentration of diffusible DHA-S in the ultrafiltrate varied in reciprocal fashion. To the protein concentration of 1.7, 3.4, 5.1, and 6.1 gm/dl the corresponding values of diffusible DHA-S obtained were 111.3, 46.9, 17.5, and 12.2 $\mu\text{g}/\text{gmH}_2\text{O}$.

4) The ratio of the bound steroid to the total amount added increased as the protein concentration increased, the corresponding values being 72.1, 88.3, 95.6, and 97.0%. The amount of the bound DHA-S was 16.0, 9.9, 7.1, and 6.0 mg/gm protein.

5) These results were analyzed according to the equations of *Freundlich* and of *Klotz*. The data seem more suitable for the equation of *Freundlich* so that the binding of DHA-S with serum protein seems to be due to physical adsorption. (pp. 457~456)

遠心限外濾過法による Androgen の 血清蛋白結合に関する研究

特に, Dehydroepiandrosterone sodium sulfate のウシ血清蛋白との
結合について

金沢大学医学部産科婦人科学教室 (指導 赤須文男教授)

石 川 久 夫

(昭和38年2月13日受付)

第1章 緒 言

著者は前報で, 遠心限外濾過法を応用することによつて, 血清中に溶解している Dehydroepiandrosterone sodium sulfate (以下 DHA-S と略す) を極めて生理的な条件下で, 容易に蛋白結合分画と非結合分画とに分離し得ることを記述した¹⁾.

Migeon and Plager²⁾ (1954) が Dehydroepiandrosterone (以下 DHA と略) を人血清から分離して以来, DHA を中心とした血中 17-Ketosteroids (以下 17-KS と略) の濃度および状態についてはかなり多くの報告がなされている. Clayton et al.³⁾ は Alumina を用いた Column Chromatography によつて, 4 人の健康男子から集めた 950cc の血漿より DHA と Androsterone (以下 Androst. と略) を分離し, その血中 17-KS 総値に対する分画比をそれぞれ 65%, 11% と報じている. また, 遊離の型をとつた血中 17-KS はとるに足らぬ微量であり, グルクロン酸結合型 17-KS も全 17-KS の 12% に過ぎず, 他の大部分は硫酸結合型であろうと考えた. 同じ頃, Migeon and Plager⁴⁾ は加水分解を加えない血漿, および, β -Glucuronidase で水解した血漿から 17-KS を抽出するのに失敗したが, 酸水解後の血漿について Paper-chromatography を用いて DHA と Androst. を分画・定量し, 血漿 100cc 中の DHA 量は 40.5 μ g で Androst. 量の約 2 倍に相当すると述べている. 血中の DHA 量については, その後も, Oertel and Eik-Nes⁵⁾ は 57.5 μ g/dl, Saier et al.⁶⁾ は加水分解に Burstein and Lieberman の Solvolysis を用いて, 男子では 38.2 μ g/dl, 女子では 50.5 μ g/dl としている. 近年, Baulieu⁷⁾ は正常人血漿と回復期患者の ACTH 投与後の血漿について, 加水分解を加えることなしに硫酸と結合した 17-KS の存在を証明し, それをさらに DHA, Androst., Etiocholanolone の硫酸結合型に分画した. 彼によれば, 硫酸結合型 DHA, Androst. および Etiocholanolone の血中正常値はそれぞれ 25.5, 14.5, 6.0 μ g/dl であるという. Conrad et al.⁸⁾ も血漿中の DHA sulfate と Androst. sulfate を直接に, 即ち, 水解操作を加えないで定量して, 血漿 100cc 中の含有量をそれぞれ男子で 155~298 μ g, 29~92 μ g, 女子では 85~166 μ g, 15~45 μ g と報告している. また, この測定法では血漿中の遊離型およびグルクロン酸結合型の 17-KS を検出し得なかつたと述べている.

以上の報告にみるように, 血中 17-KS の主要分画は DHA と Androst., 殊に DHA であり, しかも, これらは大部分が硫酸と結合して存在していることが知られる. 遊離型およびグルクロン酸結合型をとつた血中 17-KS の存在については, Cohn et al.⁹⁾, Clayton et al.³⁾, Kellie and Smith¹⁰⁾ らの報告があるが, 硫酸結合型に比べて極めて微量と考えられる.

このように DHA sulfate は血中 17-KS の中で最も主要な分画であるが, その生理学的意義は全く不明といつても過言でなく, それを解明する端緒ともいふべき血清蛋白との結合に関する研究もまた極めて少ない. 一方, Cortisol を始めとした 2, 3 の Steroidhormone については, 近年, Daughaday et al.¹¹⁾¹²⁾¹³⁾,

Slunwhite and Sandberg¹⁴⁾¹⁵⁾, Mills et al.¹⁶⁾ Booth et al.¹⁷⁾ 等によつて血清蛋白との結合に関する優れた研究がなされており, DHA sulfate についてもその研究・報告が待たれている現状である.

著者は血中における DHA sulfate の動態の一端を知る目的で, 遠心限外濾過法を用いて生理的狀態下の DHA・S と血清蛋白との結合率を測定し, DHA sulfate の生理学的意義解明の一端に寄与しようとした.

第2章 実験材料および実験方法

第1節 実験材料

血清としてはウシ血清を使用した. 屠殺後直ちに放血される血液を数時間放置した後, 遠心分離して血清を得た. なお, 血清蛋白の定量には Biuret 法¹⁸⁾を使用した.

第2節 遠心限外濾過装置

遠心限外濾過装置については前報¹⁾に既報したからここでは省略し, また, 限外濾膜も前報と同じくコロジオン濃度 4%, 乾燥時間 3 分, 厚さ 0.3 mm の和紙コロジオン膜を用いた.

第3節 温度の調節

本実験では, 生理的条件のもとで DHA・S と血清蛋白間の結合を観察するため, 常に温度を 37.5°C に調節した. 試料を入れた遠心限外濾過装置は, 37.5°C に温度を調節した恒温箱内の遠心器に 30 分間静置された後, 遠心器の蓋を開けたまま遠心にかけられた. このようにして著者は, 遠心操作中の温度を 37.5±0.5°C に保つことができた.

第4節 PH の調節

上述の方法で得られたウシ血清は CO₂ の脱出によつて pH がかなりアルカリ側に傾いているため, 生理的条件下で実験を行なうには, 脱出した CO₂ を補つて pCO₂, pH を正常値に戻すことが必要である. このために, 試料を 5% の CO₂ を含む空気と約 30 分間平衡させ, さらに, 平衡後 CO₂ が脱出するのを防ぐように限外濾過管内の試料に流動パラフィンを約 3 cm の厚さに重ねた. このことにより遠心中の水分蒸散をも同時に防ぐことができる. また, 限外濾過管を入れる気密の遠心管のガスパイプから, 5% CO₂ を含んだ空気を送り込んでこれを遠心管内の空気とおきかえた. 以上の操作により, 試料の pH を 7.3~7.5 に調節することができる. なお, pH の測定は微量ガラス電極法¹⁹⁾により 37.5°C にて測定した.

第5節 実験方法の概要

各種濃度の DHA・S 水溶液をウシ血清と任意の比率で混合し, これを遠心して濾液中の DHA・S 量から血清中の拡散性 DHA・S 量を算出した.

最初に血清中の DHA・S 濃度が蛋白結合に及ぼす影響をみるために, Table 1 の如き試料を調製した. 即ち, 0.08% の DHA・S 水溶液を順次蒸溜水で希釈し, これに等量のウシ血清を混じて DHA・S の終末濃度を 80, 160, 240, 320, 400 μg/cc とした. なお, blank としてウシ血清と蒸溜水を 1:1 に混合したものと同時に限外濾過にかけた. これら試料の各 10cc を既述の方法で pH を 7.3~7.5 に補正後, 限外濾過管

Table 1. Group of samples

Group	0.08% DHA・S Sol.	Aq. distil.	Bovine serum	Final conc. of DHA・S	Final conc. of serum protein
I	1 vol.	4 vol.	5 vol.	80 μg/cc	3.4 gm/dl
II	2 "	3 "	"	160 "	"
III	3 "	2 "	"	240 "	"
IV	4 "	1 "	"	320 "	"
V	5 "	0	"	400 "	"
VI (Blank)	0	5 vol.	"	≡ 0	"

の上節に入れて流動パラフィンを重ね、気密の遠心管に収容した。遠心は 37.5℃ の恒温箱中に 30 分間静置後、回転半径 15cm, 3000r.p.m. で 15 分間施行した。遠心後、下節のガラス容器内に貯溜した限外濾液の一部を 20% スルホサリチル酸中に滴下して蛋白の存在しないことを確かめ、次の方法で濾液の DHA・S 濃度を測定した。濾液 1 cc に蒸留水を加えて 10cc とし、これに 10vol. % の濃硫酸を添加して 100℃ で 15 分間水解後、氷水で急冷し、ついで、20cc のエーテルで 2 回抽出、各エーテル層を合わせて重曹水および蒸留水で中性になるまで洗滌した。洗滌後のエーテル層を蒸発乾固し、その残渣について Zimmermann 反応を行なった。比色は分光光度計（日立 EPU 2 型）を使用して波長 460, 520, 580m μ での吸光度を測定し、Allen の補正式を用いて補正した。同時に、既知量（25, 50 μ g）の DHA・S を同様操作で水解・抽出・発色して、これから被検濾液中の DHA・S 量を計算した。遠心後の濾液が 1 cc に達しない時には、同群試料の濾液を数個のガラス容器から集めてその 1 cc を定量に使用した。なお、DHA・S を添加せずにウシ血清のみを濾過した時の濾液中の DHA 量（blank）は、本測定法で常に 0 とみなすことができた。

ついで、血清蛋白濃度と限外濾過性 DHA・S 濃度との関係を知る目的で、ウシ血清に 1/10 容の 4mg/cc DHA・S 水溶液を混じてこれを原液とし、400 μ g/cc DHA・S 水溶液で稀釈して種々の蛋白濃度の溶液を作った。即ち、DHA・S 混合血清原液と 400 μ g/cc DHA・S 水溶液とをそれぞれ 2.5 : 6.5, 5 : 4, 7.5 : 1.5 の比で混合した。このようにすると各溶液の血清蛋白終末濃度はそれぞれ元の血清蛋白濃度の 25%, 50%, 75%, 90%（原液）となり、DHA・S 終末濃度は 400 μ g/cc となる。その後の操作および定量方法は上述の場合と同様である。

試料は多量の蛋白質を含有しているために水分含有量はその限外濾液よりはるかに少ない。従つて、濾液中の DHA・S 量から試料中の拡散性 DHA・S 濃度を推算する際には、それを溶媒単位容量当りに表わさずに単位水分量当りの量で表わす必要がある。一般に、血清の水分含有量は McLean and Hastings²⁰⁾ に従つて次式から計算される。

$$W = 99.0 - 0.75 \times P$$

W : 血清 100cc 中の水分量 (gm)

P : 血清蛋白濃度 (gm/dl)

著者も上の式を用いて血清中の水分含有量を計算し、拡散性 DHA・S の濃度を水 1 gm 当りの量で表わした。ただし血清中の水はすべて溶媒として作用する自由水とみなしてある。

第 3 章 実験成績

血清蛋白濃度 3.4gm/dl, pH7.3~7.5, 温度 37.5℃ の実験条件での血清中 DHA・S 濃度と拡散性 DHA・S 濃度との関係をみると、Fig. 1 に示されるように DHA・S 終末濃度が 80, 160, 240, 320, 400 μ g/cc の時の拡散性 DHA・S 濃度は平均 13.7 ± 1.09 , 17.0 ± 2.58 , 31.5 ± 1.43 , 44.6 ± 4.72 , $62.8 \pm 2.71 \mu$ g/gmH₂O であった。一方、DHA・S の非拡散性分画は蛋白に結合している分画とみなされるが、全 DHA・S 量に対するその分画比即ち DHA・S の血清蛋白結合率を求めると Fig. 2 の如く、DHA・S 濃度が 80, 160, 240, 320, 400 μ g/cc ではそれぞれ 83.5 ± 1.29 , 89.8 ± 1.53 , 87.1 ± 0.43 , 86.6 ± 1.43 , $84.9 \pm 0.63\%$ であり、ほとんど一定であった。また、蛋白 1 gm 当りの DHA・S 結合量を求めるとそれぞれ 2.1 ± 0.01 , 4.4 ± 0.09 , 6.5 ± 0.06 , 8.5 ± 0.15 , 10.2 ± 0.34 mg であり、Fig. 3 にみられるように 80~400 μ g/cc の範囲では DHA・S の濃度が濃くなるにつれて直線的に増加している。以上を総括して、蛋白濃度 3.4gm/dl, pH7.3~7.5, 温度 37.5℃ での DHA・S 濃度と血清蛋白結合の関係を Table 2 に表示した。

血清蛋白濃度を変化させて、それが DHA・S の蛋白結合に及ぼす影響を DHA・S 終末濃度 400 μ g/cc, pH7.3~7.5, 温度 37.5℃ の条件で観察した結果を Table 3 および Fig. 4, 5, 6 に示した。まず、Fig. 4 にみられるように血清蛋白濃度が 1.7, 3.4, 5.1, 6.1gm/dl と増加するにつれて、拡散性 DHA・S 濃度は 111.3 ± 3.69 , 46.9 ± 2.61 , 17.5 ± 2.78 , $12.2 \pm 0.64 \mu$ g/gm H₂O と減少している。一方、拡散性 DHA・S 濃度と反対関係の DHA・S 血清蛋白結合率は、血清蛋白濃度が 1.7gm/dl の時には平均 $72.1 \pm 0.92\%$, 3.4gm/dl

Fig. 1. Effect of conc. of added DHA·S on conc. of ultrafiltrable DHA·S

Fig. 2. Effect of conc. of added DHA·S on percentage of protein-bound DHA·S to total DHA·S

Fig. 3. Effect of conc. of added DHA·S on amount of protein-bound DHA·S per 1gm serum protein

では $88.3 \pm 0.65\%$, 5.1gm/dl で $95.6 \pm 0.69\%$, 6.1gm/dl で $97.0 \pm 0.15\%$ と曲線状に増加した (Fig. 5). また, 蛋白 1gm 当りに結合している DHA·S 量を算出すると Fig. 6 のように, それぞれ 16.0 ± 0.21 , 9.9 ± 0.08 , 7.1 ± 0.04 , 6.0mg であった.

Table 2. Effect of concentration of added DHA·S on DHA·S-protein binding

Final conc. of DHA·S	Conc. of ultra- filtrable DHA·S	% of ultra- filtrable DHA·S	% of protein- bound DHA·S	Amount of bound DHA·S per 1gm protein
80 μ g/cc	12.6 μ g/gm H ₂ O	15.2%	84.8%	2.1 mg/gm
	14.8	17.8	82.2	2.0
Mean	13.7 $\pm$ 1.09	16.5 $\pm$ 1.29	83.5 $\pm$ 1.29	2.1 $\pm$ 0.01
160	14.4	8.7	91.3	4.5
	19.5	11.8	88.2	4.3
Mean	17.0 $\pm$ 2.58	10.3 $\pm$ 1.53	89.8 $\pm$ 1.53	4.4 $\pm$ 0.09
240	34.4	13.8	86.2	6.4
	30.1	12.5	87.5	6.5
	30.1	12.5	87.5	6.5
Mean	31.5 $\pm$ 1.43	12.9 $\pm$ 0.43	87.1 $\pm$ 0.43	6.5 $\pm$ 0.06
Fiducial limits*	25.4~37.7	11.1~14.8	85.2~88.9	6.2~6.7
320	47.5	14.3	85.7	8.4
	59.5	17.9	82.1	8.1
	47.4	14.3	85.7	8.4
	33.2	10.0	90.0	8.9
	35.6	10.7	89.3	8.8
Mean	44.6 $\pm$ 4.72	13.4 $\pm$ 1.43	86.6 $\pm$ 1.43	8.5 $\pm$ 0.15
Fiducial limits	31.5~57.7	9.5~17.4	82.6~90.5	8.1~8.9
400	70.3	16.9	83.1	9.2
	63.2	15.2	84.8	10.4
	59.2	14.3	85.7	10.6
	58.4	14.1	85.9	10.6
Mean	62.8 $\pm$ 2.71	15.1 $\pm$ 0.63	84.9 $\pm$ 0.63	10.2 $\pm$ 0.34
Fiducial limits	54.2~71.4	13.1~17.1	82.9~86.9	9.1~11.3

* degree of confidence 0.95

Table 3. Effect of concentration of serum protein on DHA·S-protein binding

Final conc. of serum protein	Conc. of ultra- filtrable DHA·S	% of ultra- filtrable DHA·S	% of protein- bound DHA·S	Amount of bound DHA·S per 1gm protein
1.7 gm/dl	105.3 μ g/gm H ₂ O	26.3%	73.7%	16.4 mg/gm
	96.4	24.1	75.9	16.8
	116.5	29.1	70.9	15.7
	114.0	28.5	71.5	15.8
	113.3	28.3	71.3	15.9
	122.0	30.3	69.5	15.4

Mean	111.3±3.69	27.8±0.92	72.1±0.92	16.0±0.21
Fiducial limits*	101.8~120.7	24.4~30.2	69.8~74.5	15.5~16.5
3.4	56.5	14.1	85.9	9.6
	47.8	11.9	88.1	9.8
	46.8	11.7	88.3	9.8
	50.1	12.5	87.5	9.8
	41.6	10.4	89.6	10.0
	38.4	9.6	90.4	10.1
Mean	46.9±2.61	11.7±0.65	88.3±0.65	9.9±0.08
Fiducial limits	40.2~53.6	10.0~13.4	86.6~90.0	9.6~10.1
5.1	22.0	5.5	94.5	7.0
	12.2	3.1	96.9	7.2
	24.8	6.2	93.8	7.0
	11.5	2.9	97.1	7.2
	10.2	2.6	97.4	7.2
	24.4	6.1	93.9	7.0
Mean	17.5±2.78	4.4±0.69	95.6±0.69	7.1±0.04
Fiducial limits	10.4~24.7	2.6~6.2	93.8~97.4	7.0~7.2
6.1	11.5	2.9	97.1	6.0
	12.8	3.2	96.8	6.0
Mean	12.2±0.64	3.1±0.15	97.0±0.15	6.0

* degree of confidence 0.95

第4章 考按および結論

DHA が他の Steroids と同様に、血漿蛋白または血清蛋白と結合していることは周知の事実である。

Eik-Nes et al.²¹⁾ は DHA が水よりも 5% 血清アルブミン溶液によく溶解するのを認めて、これを DHA と血清アルブミンとの結合によつて説明した。Bongiovanni and Eberlein²²⁾ も血漿中の DHA が蛋白に結合しているのを確認して、その結合率は透析法および硫酸アンモンを用いての塩析法で 100%，水酸化亜鉛、トリクロル酢酸による塩析および pH3.0, 50°C で 20 分間放置による除蛋白操作で 55~93% であつたと述べている。また、Oertel and Eik-Nes²³⁾ は血中の DHA 定量に際して、血漿のエタノール分画とその残渣についてそれぞれの DHA 量を測定し、全量の約 25% を残渣中に見出した。

このように、エタノール、硫酸アンモン、トリクロル酢酸等の除蛋白剤を使用した実験では、血漿または血清の物理的、化学的な性質を変化させる可能性が極めて大きく、従つて、このようにして求められた蛋白との結合状態をそのまま生理的な状態とみなすことには、討論の余地があると思われる。さらに、試料の温度や pH 等の実験条件についても、それを生理的な値に調節することに十分な考慮がはられていないように思われる。Steroids の蛋白結合に及ぼす温度と pH の影響については諸家の報告がある。¹⁴⁾¹⁶⁾²⁸⁾²⁴⁾²⁵⁾ Schellman et al.²⁹⁾ は Testosterone とウシ血清アルブミンとの結合について 80.0°C, 25.0°C, 37.5°C の温度で検討を加え、温度の上昇と共に結合量が増加することを認めた。これに反して、Slaunwhite and Sandberg¹⁴⁾ は α -グロブリンの Cortisol 結合能は温度の上昇につれて減少すると報じ、Chen et al.²⁸⁾ も透析法と限外濾過法を用いて検討し同様の結論に達している。即ち、37.5°C では Cortisol の 6~7%

Fig. 4. Effect of conc. of serum protein on conc. of ultrafiltrable DHA·S

Fig. 5. Effect of conc. of serum protein on percentage of protein-bound DHA·S to total DHA·S

Fig. 6. Effect of conc. of serum protein on amount of protein-bound DHA·S per 1gm serum protein

Fig. 7. Relation between $\log \frac{x}{m}$ and $\log C$

(Freundlich' equation)

m : conc. of serum protein (mg/kgH₂O)

x : conc. of protein-bound DHA·S (mM/kgH₂O)

c : conc. of ultrafiltrable DHA·S (mM/kgH₂O)

が非結合型であるのに対して、4℃では非結合型が2%に減少したと述べている。なお、pHの影響については、Schellman et al.²³⁾ Chen et al.²⁵⁾ が Testosterone, Cortisol と蛋白との結合は pH の上昇によつて増加の傾向を有するのを認めている。

著者は血清の物理的・化学的性質を殆んど損わず、しかも、極めて短い時間で容易に試料を膠質分画と晶質分画とに分離し得る遠心限外濾過法を用いて、DHA・S とウシ血清蛋白との結合率を温度37.5℃、pH7.4にて測定した。まず、DHA・S 終末濃度が400 μ g/ccと一定になるよう DHA・S 水溶液を血清と任意の比率で混合し、数種の血清蛋白濃度における結合率を求めてその値から正常の血清蛋白濃度での結合率を推算した (Fig. 5 参照)。それによれば、pH7.4、温度37.5℃、蛋白濃度6.8gm/dlでの DHA・S 蛋白結合率は約96~97%とみなされる。DHA・S 等の

Steroids を血漿またはアルブミン溶液等に添加する際、そのまま試料に溶解させる方法は Steroids の水に対する比較的低溶解性から考えて、完全に溶けずに試験管壁等に附着したまま残つたり、蛋白と結合していないのに限外濾膜を透過しないで非拡散性分画に入れられる危険性がある。従つて、水に溶解させた Steroids 溶液を血清と任意の比率で混合して、蛋白結合率と蛋白濃度との関係を求めた本法の方が、より正確な実験成績を得るのに適していると考えられる。なお、DHA・S の蛋白結合に関する研究報告は全く見当たらないが、近年 (1961年)、Chen et al.²⁵⁾ は著者と同様遠心限外濾過法を用いて遊離型の DHA と血漿蛋白との結合率を測定し、著者の DHA・S における成績とほぼ一致した約92~95%の値を報告している。

血漿中 DHA・S 値は Baulieu⁷⁾ によれば 25.5 μ g/dl, Conrad et al.⁸⁾ によれば 80~300 μ g/dl とされており、本実験で用いた試料の DHA・S 濃度はかなり高濃度であるが、DHA・S 終末濃度が100~400 μ g/ccの範囲では85~90%と結合率はほぼ一定であることから (Fig. 2)、DHA・S の濃度による結合率の変動は殆んどなく、生理的濃度においてもこの程度の結合率を示すものと推測される。

Daughaday¹¹⁾¹²⁾, Mills et al.¹⁶⁾ の報告によれば、Cortisol 等の蛋白結合には α -グロブリンとアルブミンが関係しており、生理的な濃度では Cortisol 等に対して強い親和性をもつた α -グロブリンがまず結合に参加し、その結合能が飽和に達すると大きな結合能力 (Capacity) を有するアルブミンが関与してくることが明らかとなつた。Chen et al.²⁵⁾ も Cortisone と Cortisol については同様の所見をみとめたが、DHA の結合には α -グロブリンは無関係でアルブミンがその主体をなしていると考えた。同様、DHA・S と血清蛋白との結合も主としてアルブミンによるものとすれば、アルブミンの大きな結合能力から考えて、本実験でみられたように DHA・S の蛋白結合率が DHA・S の濃度に無関係でほぼ一定である事実も説明されよう。また、種々の血清蛋白濃度における蛋白1gm当りの DHA・S 結合量を求めてみると、蛋白濃度が減少するにつれて結合量は急速に増加しており、血清蛋白が極めて大きい結合能力を有していることを示している (Fig. 6)。以上の事実から、血中の DHA・S との結合に関与している血清蛋白分画は主としてアルブミンであろうと推測される。

DHA・S を始めとした各種 Steroidhormone と血漿蛋白または血清蛋白との結合の本態については、その生理学的意義と同様に不明の点が多くあり、今後の解明が待たれている。著者は今回の実験成績を Freu-

Fig. 8. Relation between $1/r$ and $1/[I]$
(Klotz' equation)
$$r = \frac{\text{conc. of protein-bound DHA} \cdot \text{S (mM/kgH}_2\text{O)}}{\text{conc. of serum protein (mM/kgH}_2\text{O)}}$$

 $[I] : \text{conc. of ultrafiltrable DHA} \cdot \text{S (mM/kgH}_2\text{O)}$

ndlich の吸着式と Klotz の理論式²⁶⁾にあてはめて、DHA・S と血清蛋白との結合の本態について理論的考察を試みた。

Freundlich の式は一般に $\frac{x}{m} = KC \frac{1}{n}$ で表わされるが、これを変形すると次式となる。

$$\log \frac{x}{m} = \frac{1}{n} \log C + \log K$$

m : 血清蛋白濃度 (mg/kgH₂O)

x : 非拡散性 DHA・S 濃度 (mM./kgH₂O)

c : 拡散性 DHA・S 濃度 (mM./kgH₂O)

n, k : 恒数

著者の成績からそれぞれ $\log \frac{x}{m}$ と $\log C$ を求めて図示すると Fig. 7 のようになり、両者の間にはほぼ直線関係がみとめられ、その相関係数は0.8504であつた。いいかえれば、著者の成績はかなりよく Freundlich の吸着式に適合するといえる。

一方、Klotz の理論式は $\frac{1}{r} = \frac{K}{n[I]} + \frac{1}{n}$ で表わされる。

r : 血清蛋白 1 分子当りの DHA・S 分子の結合数

[I] : 拡散性 DHA・S 濃度 (mM./kg.H₂O)

n : 血清蛋白 1 分子当りの DHA・S 分子の最大結合数

k : 恒数

血清蛋白の分子量を70,000として著者の成績より $1/r$, $1/[I]$ を計算し、図示したのが Fig. 8 である。なお、 $1/r$ と $1/[I]$ の相関係数は0.6962であつた。このように両者のかなり低い相関関係からみて、著者の成績を Klotz の理論式にあてはめることは困難であり、むしろ Freundlich の吸着式に適合すると考えるべきであろう。従つて、DHA・S と蛋白との結合は化学的反應というより、その大部分が物理的な吸着によるものと思われる。

以上の実験成績から、著者は次の結論を得た。

1) 遠心限外濾過法を用いてウシ血清蛋白 (濃度6.8gm/dl) と DHA・S の結合率を37.5°C, pH7.4にて測定し、それが96~97%であることを確かめた。

2) DHA・S の濃度によつて、DHA・S の蛋白結合率は変化せずほぼ一定であつた。また、蛋白濃度が減少するにつれて、単位蛋白量当りの DHA・S 結合量は急速に増加した。以上から、DHA・S の結合に関与する血清蛋白分画は、主として、大きな結合能力 (Capacity) をもつたアルブミンと思われる。

3) DHA・S と血清蛋白との結合に関する著者の実験成績が、Freundlich の吸着式にかなりよくあてはまることから、その結合は化学的な性質のものではなく主に物理的な吸着によるものと推測される。

(本論文要旨は第35回日本内分泌学会総会で発表した。)

擲筆に当り、御指導、御校閲を賜つた恩師赤須教授に心からの感謝を捧げると共に、貴重な御助言、御支援を賜つた西田助教授に感謝します。

文 献

- 1) 石川久夫 : 日本内分泌学会雑誌, 39 : 439 (1963).
- 2) MIGEON, C.J. and J.E. PLAGER : J. Biol. Chem., 209 : 767, (1954).
- 3) CLAYTON, G.W., A.M. BONGIOVANNI and C. PAPADATOS : J. Clin. Endocrinol. & Metab., 15 : 693, (1955).
- 4) MIGEON, C.J. and J.E. PLAGER : J. Clin. Endocrinol. & Metab., 15 : 702, (1955).
- 5) OERTEL, G.W. and K. EIKNES : J. Biol. Chem., 232 : 543, (1958).
- 6) SAIER, E.L., E. CAMPBELL, H.S. STRICKLER

- and R.C. GRAUER : J. Clin. Endocrinol. & Metab., 19 : 1162, (1959). 7) BAULIEU, E.E. : J. Clin. Endocrinol. & Metab., 20 : 900, (1960). 8) CONRAD, S., V. MAHESH and W. HERRMANN : J. Clin. Invest., 40 : 947, (1961). 9) COHN, G.L., R.K. BONDY and C. CASTIGLIONE : J. Clin. Invest., 40 : 400, (1961). 10) KELLIE, A.E. and E.R. SMITH : Biochem. J., 66 : 490, (1957). 11) DAUGHADAY, W.H. : J. Clin. Invest., 37 : 511, (1958). 12) DAUGHADAY, W.H. : J. Clin. Invest., 37 : 519, (1958). 13) DAUGHADAY, W.H., J. HOLLOSZY and I.K. MARIZ : J. Clin. Endocrinol. & Metab., 21 : 53, (1961). 14) SLAUNWHITE, W.R. Jr. and A.A. SANDBERG : J. Clin. Invest., 38 : 384, (1959). 15) SANDBERG, A.A. and W.R. SLAUNWHITE, Jr. : J. Clin. Invest., 38 : 1290, (1959). 16) MILLS, I.H., H.P. SCHEDL, P.S. CHEN, Jr. and F.C. BARTTER : J. Clin. Endocrinol. & Metab., 20 : 515, (1960). 17) BOOTH, M., P.F. DIXON, C.H. GRAY, J.M. GREENAWAY and N.J. HOLNESS : J. Endocrinol., 23 : 25, (1961). 18) 斎藤正行 : 光電比色計による臨床化学検査, 第5版 (1954), 130頁, 南山堂. 19) 斎藤幸一郎, 本田良行 : 日新医学, 42 : 167, (1955). 20) Mc LEAN, F.C. and A.B. HASTINGS : J. Biol. Chem., 108 : 285, (1935). 21) EIK-NES, K., J.A. SCHELLMAN, R. LUMRY and L.T. SAMUELS : J. Biol. Chem., 206 : 411, (1954). 22) BONGIOVANNI, A.M. and W.R. EBERLEIN : J. Clin. Endocrinol. & Metab., 17 : 238, (1957). 23) SCHELLMAN, J.A., R. LUMRY and L.T. SAMUELS : J. Am. Chem. Soc., 76 : 2808, (1954). 24) CHEN, P.S. Jr., I.H. MILLS and F.C. BARTTER : Fourth International Biochemical Congress, Vienna, (1958). [文献16] より引用] 25) CHEN, P.S. Jr., I.H. MILLS and F.C. BARTTER : J. Endocrinol., 23 : 129, (1961). 26) KLOTZ, I.M., F.M. WALKER and R.B. PIVAN : J. Am. Chem. Soc., 68 : 1486, (1946).