NaCl-Ac 濁濁度試験. III. ヘパリンによる濁濁度の増加と血清リポ蛋白との関係

本 間 運 隆

(名古屋大学農学部畜産学科)

産卵鶏や estrogen 処置をした鶏の血液中には、イオン強度が比較的弱く pH が 7.1 からの適当な組成の稀釈液で稀釈した際に白濁を生ずる血清蛋白を含んでいる。この濁濁を利用して産卵鶏の血液性状の変化をしらべる際に著者のこれ迄用いて来た方法は、a) 蒸溜水で血清又は血漿を 100 倍前後に稀釈した後酢酸を加えて pH を 7.2 乃至 7.3 に調節する方法、b) M/100 又は M/200 の veronal buffer で稀釈する方法 (予め pH を 7.2 にしてあるので調整を測定毎に行わなくても済む丈の改良を a) に行なつたもの)、c) NaCl-Ac 液 (この組成は前報¹⁾で述べた。濁濁の原因となる物質は前記の 2 つの方法とかなり異つている) を用いて稀釈する方法、の 3 つの方法があつた。この中で c) の方法は産卵状態を濁濁度がよく反映すること、沈澱をあつめて化学的分析を行なうのに都合がよいこと等の利点があるので、主要な実験に専ら c) の方法を用いて来た。

ところが最近原因不明の濁濁が雄鶏血漿を材料として実験を行なつた場合にもしばしば認められるようになった。元来 NaCl-Ac 液の組成を決定する際には材料には血漿を用い、しかも産卵鶏で陽性、雄鶏で陰性の反応を示すことを条件としたのであるからこの濁濁の発生は一瞬理解に苦しむ現象であつた。農技研の姫野氏から雄血清ではこのような濁濁の発生が全くないこと、又ヘパリン (以下 H と略) そのものも NaCl-Ac 液によく溶けるが、血清と H とを同時に NaCl-Ac 液に加えるとかなりの濁濁を生ずるとの御指摘があつた。著者の使用していた H の製剤をしらべてみると最近になつて使用製剤の濃度が増加していた。これに気付かず使用した為に血液凝固防止の際に血漿中に持ち込まれる H の量が増加しその為に雄鶏血漿のあるものが濁濁を示したと考えれば一応説明がつく。即ち雄鶏血漿が NaCl-Ac 反応陽性になつた原因は血液そのものにあつたのではなく、又 NaCl-Ac 液にあつたのではなく、単に凝固防止に用いた H が

多過ぎたことによる。従つて濁濁度の測定に際し出来れば血清を使用し、又血漿を用いるときには H の使用量を必要最小限度に止めれば濁濁度の値にはそれ程影響はないと思われる。

H と作用して濁濁を生ずる物質は何であろうか、雄鶏の血清中にあるとすれば当然産卵鶏の血清中にも存在することが予想される。H そのものは NaCl-Ac に溶けるのだから濁濁の発生は血清中に溶けていた成分と結合物を作り、その結合物が NaCl-Ac 液に難溶なことによるのであろうと考えて H と結合するような物質を調べてみたところ文献には多くの例が挙げてある²⁾。中でも H と最も密接な関係があるのは血中の脂質であつて、H 発見の手掛りとなつた血液凝固防止作用や、最近問題となつている H の lipemia clearing action 等は何れも lipoprotein と H の相互関係を知つて初めて理解しうる現象である。そこで先ず H と鶏血清 lipoprotein との関係をしらべることにした。

1. 血清 lipoprotein と Heparin との関係

前報³⁾で述べたように estrogen を注射すると、雄鶏でも血中に多量の lipoprotein が出現し、その増加した lipoprotein の量は estrogen 注射前後の血清蛋白量を屈折計と biuret 反応から求め差引計算をして概算するこ

Fig. 1 Effect of heparin-Na on the NaCl-Ac turbidity in sera of estrogenized roosters.

NaCl-Ac turbidity test in the plasma of laying hens. III. Formation of heparin-lipoprotein complex and its relation to the NaCl-Ac turbidity test. HOMMA, K. (Dept. Animal Physiol., Fac. Agric., Nagoya Univer.) *Jap. J. Animal Reprod.* 5, (1).

Table 1 Serum lipoprotein level, serum calcium and heparin-induced increment in NaCl-Ac turbidity.

Serum lipoprotein* g %	Serum calcium mg/dl	Increment in turbidity** E × 1,000
3.83	40.2	130
3.78	32.8	113
3.52	34.6	111
3.36	30.0	107
3.05	28.9	103
2.94	26.9	84
2.40	22.6	93
2.00	21.0	75
1.54	20.4	63

*: determined by a refractometer.

**: (NaCl-Ac turbidity in the presence of 100 μ g heparin-Na) - (NaCl-Ac turbidity determined without added heparin-Na).

とが出来る。この方法を利用して estrogen 処置雄鶏(計約 60 羽)について H と lipoprotein 量によつて NaCl-Ac 濁濁度がどの様に変化するかを調べた。H は製剤による差異があるものと考えこの実験では NBC の H-Na (Lot No. 580523) のみを用いた。血清は鶏を断頭放血して、食道内容物の混入のないように注意して血液を小ビーカーに集め、37°C の孵卵器に約 1 時間放置して分離した。この血清 0.1 ml を 10 ml の NaCl-Ac 液で稀釈し型の如く濁濁度を測定した後、少量の H-Na を加えては濁濁度を測定し、濁濁度と H との関係について第 1 図に示す結果を得た。H-Na の添加量が 100 μ g をこえると、H-Na による濁濁度の増加は頭打ちをしてしまうので以後の実験では H-Na の添加量は 100 又は 125 μ g とした。第 1 表には estrogen 注射によつて増加した血清 lipoprotein の量と H-Na 100 μ g 添加による濁濁度の増加との関係を示した。少量の H-Na によつて凝固防止を行なつた血漿を用いた結果もほぼ血清の場合と同じであつた。第 1 表で明らかのように血清中の lipoprotein が増加するにつれて、H 添加による濁濁度も増加して行く。このことは H と結合しないときには殆んど完全に NaCl-Ac 液に溶解している lipoprotein が H と結合することによつて難溶性になることを意味しているのであろう。前報の結果⁹⁾ からこの lipoprotein は超遠心法での分類に従えば chylomicron か β -lipoprotein に属する比較的 protein-N の含量の低い種類と思われる。尚表中には血清の総 calcium の値を示してある。この値から 8 mg/dl を引くとほぼ結合 calcium を示すから、一見この増加した lipoprotein の中に多量の calcium を含んでいる様に感じられるが、実際には calcium の結

Table 2. Effect of heparin-Na on the NaCl-Ac turbidity in cow serum.

Heparin dose (mg/10ml)	NaCl-Ac turbidity (E × 1,000)	No. of animals
0	0	
0.10	12.5 ± 2.2*	10
1.00	25.6 ± 4.9	10

*: 95% fiducial range. The mean serum protein concentration was 7.48 ± 1.04 g%.

合しているのは他の血清蛋白なのである。この点に関しては他の機会に更に詳細に報告する予定である。

2. 雄鶏血清と Heparin との関係

H と鶏血清蛋白との関係をしらべようとした動機は雄血漿が原因不明の NaCl-Ac 濁濁度を示す為であつた事は最初に述べた通りである。ところが雄鶏でも濁濁度の値を決定するのは必ずしも H 量丈ではなく種々の因子によつて変化することが分つた。例えば 27 羽の雄(体重 1.2 kg)の血清に 125 μ g の H-Na を加えて濁濁度を測定し 18.18 ± 2.17 であつたが、1 週間後に同じ群を用いて再び採血すると 7.80 ± 0.96 と明らかな低下を示した。これに類似な現象は産卵鶏の採血に際してもよく観察される。H 添加による雄鶏の濁濁度は何によつて生ずるのであろうか、estrogen を注射した雄鶏と同じ lipoprotein が注射前にも血中に存在し単に量が少ない丈ではなからうか。現在迄の結果では雄鶏血清にも少量の estrogen 注射後に見られると同様の lipoprotein が存在し濁濁の主因となつているようであるがその他の血清蛋白もやはり濁濁の原因となつているらしい。

3. 牛血清における Heparin と濁濁度の関係

Lipoprotein が H による濁濁度増加の原因であるとなれば、血清中にかなりの lipoprotein を含む牛血清ではどうであろうか。10 例について行なつた実験の結果では牛血清でも H を多量に加えると NaCl-Ac 濁濁度が認められるようになる。果してこれが lipoprotein によるかどうかを吟味していないが、H と結合する物質の性質は鶏とは著しく異なつている。H 添加量が 100 μ g になつても濁濁度の値は低いが、1 mg 以上を加えても尚濁濁度が増加し、添加量が 10 倍になると濁濁度が 2 倍になる。

4. 鶏血清に Heparin 以外の物質を加えた場合

これ迄述べて来た結果から H を用いて鶏の血清 lipoprotein の量を測定することが可能と思われる。しかし H は lot が変ればその生理作用も変ると言われ、当然

濁濁度反応に対しても製剤による差がかなりあるものと覚悟せねばならない。その上自分で作るとしても純粋なものを作ることも望めないし、購入するとしても相当高値である。

そこで合成血液凝固防止剤として最近用いられるようになった DS-Na (dextran sulphate の Na 塩) と H の化学構造が似ているのでこれを用いて H と同様 estrogen 注射をした雄鶏血清の濁濁度に対する影響をしらべた結果はほぼ H と同じ成績を得た。従つて添加実験を定量に用いる際には DS を用いる方がよいと思う。尚用いた DS は名糖産業の多賀氏より恵受を受けたもので S 含量 15~16%, 分子量 3,000~4,000 との事である。

5. Veronal-HCl buffer 中での Heparin の効果

Casein と H との結合⁴⁾物に見られるように濁濁度の増加は単に結合による等電点の変化に由来しているのかも知れない。Casein の場合は 1 mg/ml の場合に H を 0.1 mg/ml の割合で添加すると pH 5.8 乃至 5.3 では濁濁が消失する代りに pH 3.5 乃至 1.9 ではそれ迄透明であつたのが濁濁を生ずると言う。鶏の血清では pH 7.2 の M/100 veronal buffer を加えて濁濁度を測定しこれに H-Na を加えて行くと NaCl-Ac 液のときと同様にやはり濁濁度は増加する。しかし 30 μ g 以上を加えるとかえつて減少を示すがその程度は弱く、100 μ g を加えても 30 μ g のときに比して 5% 位低くなるに過ぎない。又 H による最大の濁濁度増加も NaCl-Ac のときに比較するとかなり少ないので結合による等電点のずれが濁濁発生の 1 つの大きな因子であることは疑いない。しかし血清の中の蛋白には各種のものがあつて或るものとの結合は濁濁度の増加を、又その他のものとの結合は濁濁度の減少を来し、H の量とそれ等の各々の蛋白成分との関係により上記の如く一度増加して再び減少と言う結

果になつたのだと考えられる。

考察及び結論

以上 H と血清との関係を濁濁度試験の基礎実験の一つとして追求した結果、H によつて濁濁度の値、又その意味する内容がかなり変化することが明らかになつた。NaCl-Ac 試験に限つて考えればこの H 添加による濁濁度の増加は鶏の場合には血清中の lipoprotein と H との結合によるのであるけれども、同じ試験を牛血清で行なつた場合には濁濁の出現はあるけれどもその解釈はことなつてくる。

H 以外の物質例えば DS-Na でも同様の結果が得られることは、この lipoprotein の血管壁への沈着や、集合して卵黄中に移行する際の mechanism の解明にも何かヒントを与えてくれる様な気がする。ZONDEK⁵⁾ は estrogen によつて鶏の肺に栓塞の生ずる例を報告しているが、肺に多量の H のある事を考えると estrogen によつて増加した lipoprotein が H 又はその類似物質と結合する結果だとも解釈出来る。

H は生体内に見られる成分であるから、循環血中にも当然少量は存在するとは思われるが、血液を体外にとり出した時に凝固を防ぐ程の多量は存在しないのであるから NaCl-Ac 反応に影響を与える量とは思われない。

(1959. 4. 2. 受付)

文 献

- 1) 本間(運)・富田(武)・大川(隆): 本誌 3, 133, 1958.
- 2) CHARAGAFF, E.: *Advances in Protein Chemistry* 5, 49, 1945. Interscience Pub. Inc. New York.
- 3) 本間(運)・佐藤(孝)・本岡(豊): 本誌 4, 164, 1959.
- 4) JAKES, L. B.: *Biochem. J.* 37, 189, 1943.
- 5) ZONDEK, B. & L. MARX: *Arch. Int. Pharmacodyn.* 61, 77, 1939.

Summary

Additions of Heparin-Na to the serum of estrogenized roosters caused a striking increase of the NaCl-Ac turbidity value. This phenomenon suggests that the serum lipoprotein forms a heparin-lipoprotein complex, not soluble in the NaCl-Ac solution. The faint NaCl-Ac turbidity observed in the heparinized plasma of untreated roosters, also may be interpreted as the result of the same phenomenon.