カルシウム及びマグネシウム代謝

Studies on the Metabolism of Calcium and Magnesium

(第 1 報) 実験方法と血清透析性 Ca 及び Mg 測定方法の検討

Part I. Its Basal Experiment and Insection about Determination of Serum Calcium ion and Magnesium ion by New Method

(昭和 28 年 12 月 2 日受理)

柳 澤 文 正 永瀬 喜代子
(Fumimasa Yanagisawa) (Kiyoko Nagase)

(第 68 回 日本生化学関東支部会発表)

生体内に於ける Ca 及び Mg 代謝の研究は既に多くの人々により行われているが、今日迄イオン化された Ca 及び Mg の測定が困難であつたため、この研究は殆んど行われていない。

余は最近 Ca 及び Mg の微量新定量法を作成した。この方法は 1-hydroxy-4 chloro-2.2 diazobenzen-1.8-dihydroxy-naphthalene-3.6-disulfonic acid disodium salt のアルカリ溶液が Ca 及び Mg の存在で赤色に變色する。然し Mg は強アルカリでは $Mg(OH)_2$ となり變色しない。この原理を用いて定量する方法である。これは體液・食品・水質硬度の定量ばかりでなく、体液の透析性 Ca 及び Mg (広義の Ca 及び Mg イオン) の測定が可能である。この方法を用いて代謝を研究せんとする。尙血清無機磷並びに血清總蛋白をも合せ測定した。

実験方法

1. 血清 Ca と透析性 Ca の測定法¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾

試 薬

1. 2.5×10^{-4} 1-hydroxy-4 chloro-2.2 diazobenzen-1.8-dihydroxy-naphtalene-3.6-disulfonic acid disodium salt 溶液。本試薬は分子量 519 で純粋なものを使用すべきである。(住友化学 Plasmocorin B の商品名で販賣されている)容量コルベン 100 cc に染料 0.1298 g を正確に秤量し、0.1 NHCl 溶液 10 cc を加え蒸留水で 100 cc とする (貯藏溶液)。この溶液 10 cc をとり蒸留水で 100 cc とする。

2. 2 N-NaOH 溶液

3. 4 % 尿酸安門溶液

4. 標準溶液 Ca として 1 cc 中に 20 γ を含有する溶液。(CaCO₃ 使用)

標準グラフの作り方

Ca 標準溶液の 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 cc を Absorption tube にとり、これに蒸留水を加えて全量 0.5 cc とする。各液は 0, 2, 4, 6, 8, 10 γ の Ca 量を含む。この各管に試薬 (1) 2 cc, 更に試薬 (2) 2.5 cc を加え、3 分後 620 m μ の Filter を用い、零濃度のものを Blank とし、これを Transmittance の 50 % に合せ各液を測定する。

實 施

清淨な試験管に蒸留水 0.4 cc を採り、新鮮な血清 0.1 cc を正確にピペットで採り蒸留水に加え、2~3 回ピペットの内壁を蒸留水で洗う。盲檢液としては蒸留水 0.5 cc を試験管に採る。これらに試薬 (1) 2 cc, 試薬 (2) 2.5 cc を加え、前期の如く 620 m μ の Filter を用い、Blank を Transmittance の 30 % に合せ 3 分後測定する。これは Ca のみの値である。

血清透析性 Ca の場合は蒸留水のかわりに 4 % 尿酸安門溶液を用いればよい。即ち試験管に試薬 (3) 0.4 cc を採り血清 0.1 cc を加える。直ちに指先で試験管の底部を數回強くたたき、泡立つ迄混和する。(室温 20~25°C) 正確に 3 分後試薬 (1) を 2 cc 加え更に試薬 (2) を 2.5 cc 加えて正確に 3 分後、血清 Ca の定量の場合と同様に、620 m μ の Filter を使用し、Blank を Transmittance 30 % に合せ、透過率を測定する。この場合 Blank としては多少尿酸安門が影響するので、試薬 (3) 0.4 cc と蒸留水 0.1 cc、これに試薬 (1) 2 cc, 試薬 (2) 2.5 cc を加えたものを用いた方がよい。これは血清結合型 Ca の

値である。

計 算

標準グラフを作製しこれより血清 Ca の値が求められる。又血清結合型 Ca の値を引けば、その差が血清透析性 Ca 量である。

2. 血清 Mg と血清透析性 Mg の測定法¹⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾

試 薬

1. $2.5 \cdot 10^{-4}$ M. 1-hydroxy-4 chloro-2.2 diazobenzen-1.8 dihydroxy-naphthalene-3.6 disulfonic acid disodium salt 溶液

2. 0.2 N NaOH 溶液

3. 10 N NaOH 溶液

4. 標準溶液 Ca として 1cc 中 20 γ, Mg として 1cc 中 10 γ を含有する溶液。(Mg の標準溶液は $Mg SO_4 \cdot 7 H_2O$ 使用)

標準グラフの作製

圖の如く標準グラフを作製する。

第 2 表 Ca 及び Mg の標準曲線

實 施

清浄な試験管に蒸溜水 0.4 cc を採り、これに血清 0.1 cc を加え、試薬 (1) 2 cc, 試薬 (2) 2.5 cc を加える。Blank としては蒸溜水 0.5 cc, 試薬 (1) 2 cc, 試薬 (2) 2.5 cc を用いる。試薬 (2) を加えて正確に 3 分経過したときに 620 $m\mu$ の Filter を使用し、Blank を Trans-

mittance 50 % に合せ、透過率を測定する。この値は Ca と Mg の値である。測定後各溶液に試薬 (3) 0.5 cc を加えよく混和し 5 分後同様に透過率を測定する。この値は Ca のみの値である。

血清透析性 Mg の測定は上述の方法で試薬を入れる順をかえるだけである。0.2 N NaOH 溶液 0.4 cc を試験管に採り、これに血清 0.1 cc を加え、試験管の底を指先で強くたたき、泡立つまで混和する。(20~25°C) 正確に 3 分後試薬 (1) 2 cc 加え、蒸溜水 0.4 cc, 試薬 (2) を 2.1 cc 加え、正確に 3 分後上述と同様に操作し透過率を測定する。この値は血清結合 Mg の値と總 Ca の値である。

計 算

標準グラフを用い血清總 Mg 及び透析性 Mg を求められる。第 2 表の 10 N NaOH 溶液を加えた場合の標準線上に先ず Ca 量を求める。(この場合は 10 γ) 次に Ca 10 γ を 0.2 N NaOH 溶液の場合の標準線上にとり、Per Cent Transmittance より Mg の標準線と平行線を引き、その線に總 Mg を求める。(この場合は 1.8 γ) 同様に、結合型 Mg を差引けば透析性 Mg の値である。(第 2 表参照)

3. 血清無機磷の測定法¹⁾

Fiske & Subba Row 法により血清 0.2 cc を使用し光電比色計を用いて測定した。

4. 血清總蛋白の測定法¹⁾

Biuret 法により血清 0.1 cc を使用し光電比色計を用いて測定した。

以上記述した各測定法を用いて代謝を研究せんとする。

I. 血清透析性 Ca 及び Mg 測定法の検討

血清透析性 Ca 及び Mg の正確さに就ては、既に原著²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾に詳しく記述したが、代謝研究に當り動物実験により再吟味しその正確さを検討し基礎実験とした。

動物実験

無機磷との関係により血清透析性 Ca の正確さを吟味して見た。

第 1 図 動物実験
(1 回 2 cc 採血)

20 kg 前後の健康家兎を用いて、朝食を與えずに第 1 回より 2 時間毎に 3~4 回、更に翌朝第 1 回より 24 時間目に 1 回、耳靜脈から 2.0cc の場合と 5.0 cc の場合と、家兎數匹について採血分析を行った。

第 1 圖並に第 2 圖 A, B の如く、2.0 cc 採血の場合は透析性 Ca 其の他の成分の変動も少いが、5.0 cc の大量採血となると、第 2 圖 A の場合は 4 時間以内に透析性 Ca が 1.1 mg dl 上昇しているのに對し、無機磷は 0.4 mg/dl 下降を示し、第 2 圖の場合には透析性 Ca 0.4 mg dl 下降せる

に對し、無機磷 0.4 mg/dl 上昇を示し A も B も共に透析性 Ca と無機磷とが一線を介して全く相對的な變動曲線を畫き、透析性 Ca と無機磷とが理論のみでなく實際に逆相關にあることを如實に證明している。このことは、 $[Ca^{++}] \times [PO_4^{---}] = K$ の公式を證據立てるもので、この方法の透析性 Ca が正しいことを他のイオンの關係から立證し得たものである。

なお透析性 Mg は無機磷と相關、且つ透析性 Ca と逆相關の關係にあり、なお透析性 Mg は總 Mg よりも變動が強く且つ無機磷の増減に先立つて現われる。

同様に透析性 Ca に於ても總 Ca より變動が強い。即ちイオンの動きというものが常に第一義的であると言える。又家兎の採血量により、血清中の上記成分に變動あることを認めた。多量の採血は實驗上非常に誤謬を來し易い。

II. Parotin を皮下注射した場合

緒方氏等の發見による唾液腺より抽出した粗パロチンが、血清 Ca を低下することが實證されている¹⁰⁾。こ

第 2 圖 A 動物實驗
(1 回 5.0 cc 採血)

第 2 圖 B 動物實驗
(1 回 5.0 cc 採血)

こではこの粗パロチンを用い、健康家兎 (2 kg 前後) に 5 mg を皮下注射してその結果をしらべた。第 3 圖、第 4 圖に示す如く明らかに血清總 Ca の低下は認められ、又蛋白も同様低下する。血清透析性 Ca、無機磷共に低下する。血清透析性 Mg は上昇する如く見られる。

III. 副腎摘出の場合

健康な家兎を用い、兩副腎を出来るだけ完全に摘出しようと試み、成功した

ものは 2~3 日で死亡し副腎皮質の一部が血管壁に固着している部分をいささか多く取り残したものは生存した。これは一カ月後、剖見により僅かの代償肥大を認め

第 3 圖 Parotin 5mg 皮下注射した場合
(家兎 2kg)

第 4 圖 Parotin 5mg 皮下注射した場合
(家兎 2kg)

第 5 圖 副腎摘出の場合 (死亡)

た。第 5 圖と第 6 圖はその場合の分析結果である。

第 5 圖に於て血清總 Ca は 13.5 から 9.4 ~ 7.4 mg と著しく減少し、3 日目に死亡し、透析性 Ca は手術の翌日より上

第6図 副腎摘出の場合(生存)

れる。

結 論

- 1) 柳澤法による血清総 Ca, Mg 総及び血清透析性 Ca, Mg の測定法について述べた。
- 2) 動物実験の基礎実験に於て時間的に多量採血することは血清成分、特にイオンの変動著しく、実験上誤謬を來し易い。
- 3) 柳澤法による血清透析性 Ca 及び Mg 測定の正確

さを、動物実験を用いて無機磷との関係から吟味し、正しく逆相關、相關を示した。

- 4) Parotin 注射の場合は血清透析性 Ca と無機磷とは逆相關にならない。
- 5) 副腎摘出の家兎は血清総 Ca の低下が認められる。

文 献

- 1) 柳澤文正：新潟醫學會雜誌, 65, 11, 761, 1951.
- 2) 柳澤文正：新潟醫學會雜誌, 65, 12, 838, 1951.
- 3) 柳澤文正：新潟醫學會雜誌, 66, 2, 90, 1952.
- 4) 柳澤文正：新潟醫學會雜誌, 66, 5, 302, 1952.
- 5) 柳澤文正：新潟醫學會雜誌, 66, 12, 829, 1952.
- 6) 柳澤文正：日本醫事新報, 1475, 32 (2552), 1952.
- 7) Fiske & Subba Row: J. Biol. Chem., 66, 375, 1952.
- 8) Gornall, A. G., Bardawill, C. J. & David, M. M.: J. Biol. Chem., 177, 751, 1949.
- 9) 緒方章, 伊藤四十二等：醫學と生物學, 5, 253, 1949.
- 10) 伊藤四十二：生化學, 25, 1953.

(東京都立衛生研究所)