

## 脂血症明澄因子の作用機序に関する研究

東京女子医科大学第一生理学教室 (主任: 養島高教授)

星 合 之 代  
ホシ アイ ユキ ヨ

(受付 昭和 35 年 4 月 1 日)

## I 緒 言

近年脂質代謝と動脈硬化症に関しては多数の業績が発表されており、また動脈硬化症の成因に重要な関係を有するものと思われている脂血症明澄因子に対してもおびただしい報告がなされ動脈硬化症の研究、ひいては老化現象の解明に寄与している。

1943年 Hahn<sup>1)</sup> はヘパリンを犬に静脈注射すると生体内で犬の食餌性脂血症を明澄化し得るが、試験管内ではこのような作用のないことを発見して以来、ヘパリン静注後の血清中での活性物質、いわゆる明澄因子は組織中の1種の酵素、すなわち蛋白質脂質分解酵素とみなされ、その作用機序、本態ならびに作用物質の分離抽出など<sup>2)~9)</sup>の仕事は多数なされているが、本物質作用時の無機質の影響については僅かに Meng<sup>10)</sup>、Korn<sup>11)</sup>、Brown<sup>3)</sup>、Sommer<sup>12)</sup>、および Day<sup>13)</sup>ら、の報告があるに過ぎない。しかしながら明澄作用におよぼす無機質の影響は、本物質の分離精製や抽出物の力価測定などに際し極めて重要な問題であると考え、その第1歩として Meng<sup>10)</sup>、がその報告中に用いている媒質中に加えてある酢酸ソーダの明澄活力におよぼす影響を検討し、さらに酢酸カリウムならびに Day<sup>13)</sup>が検討を加えた酢酸ウラニウムについて *in vitro* における影響を観察した。

またヘパリンの明澄作用機序に関しては未だすべてが明らかにされているわけではなく種々の説があるが、脂肪酸が遊離されることは多くの研究者<sup>3)14)~23)</sup>が報告している。すなわち食餌性、あるいは注射による脂血症の実験動物、および人体にヘパリンを静注して得た血漿にはいちぢるしい遊離脂肪酸(以下 N.E.F.A と略す)の増加と総脂肪酸の減少が認められ<sup>18)23)</sup>、正常および断食後の実験動物、人体においてはその増加と減少は僅かであり、さらに *in vitro* においてヘパリン静注後の実験動物、および人体の血漿を適当な蛋白質脂質と共に辨

置しても脂肪酸の遊離が認められ、その際にリン脂質、コレステリンなどはいちぢるしい影響はうけず脂肪酸とともにグリセリンが証明せられるといわれ、<sup>15)16)24)</sup> また N.E.F.A. の増加と濁濁度の減少は平行し、明澄作用がある程度にまで達すると増加した N.E.F.A. そのものにより明澄化は抑制<sup>15)</sup>され、この際血清アルブミンを授与するとまた明澄作用は進行する、これはアルブミンがもつとも強力な脂肪酸の受容体になるためと考えら<sup>18)20)25)26)</sup>れている。

著者はこれらの報告にもとづき脂血症明澄物質の作用機序をさらに究明すべく、*in vitro* において犬のヘパリン静注後血漿と落花生油乳剤を加えて辨置し、N.E.F.A. の増加および明澄因子活力を測定し、脂肪酸の遊離が明澄作用機序におよぼす意義についても2.3の知見を得たので報告する。

## II 実験方法

## 1. 実験動物

体重6~9kgの健康な成熟雌犬を20~22時間絶食後ラボナール0.3g静注により麻酔し、体重1kg当り1mgのヘパリンソーダを静脈注射し、注射後20分で股動脈より採血してこれに10%滅菌クエン酸ソーダ液を5%の割合に加え、血漿を分離し、この血漿を用いた。

## 2. 脂肪乳剤

1) オリーブ油乳剤:市販オリーブ油<sup>27)</sup>に10倍量の無水エチールアルコールを加え、コルメン中にて80°Cに保ち1時間攪拌混合し、その後80°Cに加熱した蒸留水をオリーブ油の10倍量徐々に加え、さらに1時間攪拌する。その後表面積の大きな容器に移し、非乳化の脂肪を除去してアルコールを蒸発させ、残った油の量に対し1/10量の Tween 80 を安定剤として加え、さらに加熱を続けて水分を蒸濃濃縮して乳化オリーブ液をつくり、この乳剤濃度を約0.1%に調製した。

2) 落花生油乳剤:市販 Lipomul (upjohn 社製) を

第 1 表 酢酸ソーダの影響

実験番号		* 酢酸ソーダ%											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15
No. 1	混和直後	0.245	0.246		0.249		0.243		0.245		0.240		0.249
	60分 "	0.238	0.225		0.231		0.225		0.221		0.219		0.220
" 2	混和直後	0.289	0.291	0.290	0.290	0.283	0.286	0.280	0.290	0.286	0.280	0.283	0.281
	60分 "	0.280	0.280	0.273	0.272	0.261	0.265	0.243	0.259	0.251	0.250	0.242	0.240
" 3	混和直後	0.256	0.249	0.248	0.251		0.248		0.252		0.248	0.251	0.251
	60分 "	0.240	0.222	0.220	0.222		0.220		0.210		0.200	0.199	0.201
" 4	混和直後	0.310	0.308		0.301		0.303		0.308		0.305		0.302
	60分 "	0.289	0.270		0.273		0.289		0.259		0.248		0.252
" 5	混和直後	0.221	0.225		0.225		0.224		0.220		0.222	0.226	
	60分 "	0.196	0.195		0.200		0.192		0.180		0.182	0.190	
" 6	混和直後	0.250	0.251	0.254	0.245	0.246	0.241	0.254	0.243	0.250	0.252	0.249	0.248
	60分 "	0.220	0.211	0.222	0.220	0.211	0.202	0.196	0.187	0.195	0.200	0.190	0.188
" 7	混和直後	0.280	0.275	0.275	0.278	0.276	0.280	0.282	0.279	0.280	0.280	0.270	
	60分 "	0.248	0.245	0.260	0.240	0.251	0.225	0.242	0.238	0.240	0.238	0.230	
平均	混和直後	0.264 ±0.0279	0.263 ±0.0270	0.266 ±0.0167	0.262 ±0.0253	0.268 ±0.0160	0.260 ±0.0267	0.272 ±0.0128	0.262 ±0.0285	0.272 ±0.0157	0.261 ±0.0263	0.255 ±0.0195	0.266 ±0.0217
	60分 "	0.244 ±0.0299	0.235 ±0.0393	0.243 ±0.0232	0.236 ±0.0252	0.241 ±0.0215	0.231 ±0.0312	0.227 ±0.0219	0.222 ±0.0295	0.228 ±0.0242	0.219 ±0.0246	0.210 ±0.0216	0.220 ±0.0237

\* 酢酸ソーダ%は磷酸緩衝液に含まれる濃度。

各数字は被検液の混和直後および 37°C で 60 分間静置後の吸光度。

用い、用に臨み蒸留水で稀釈使用した。

3. 血漿明澄因子の測定

1) pH6.4, 0.15Mの磷酸緩衝液 3.2ml 中に1%~15%の濃度に酢酸ソーダ, および酢酸カリウムを加え, これに0.1%のオリブ油乳剤 0.8ml と血漿 1.0ml を混和して 37°C で1時間孵置し, 孵置前後の濁濁度の変化を日立 EPO-B 型光電光度計を用い, 660m $\mu$ の波長の下に測定して吸光度の減少値を求めた。

2) ヘパリン静注後血漿 1.0ml を試験管にとり, これに0.2% 落花生油乳剤 0.5ml を加え, さらに 0.15M pH6.4 磷酸緩衝液を 1.5ml 添加混和し, 37.5°C の恒温槽中におおの30分, 1時間, 2時間, 3時間, 4時間孵置したのち, 孵置前後の濁濁度の変化を日立 EPO-B 型

光電光度計を用い波長 660m $\mu$  で蒸留水を対照として吸光度の減少値を求めた。

4. N. E. F. A. の測定

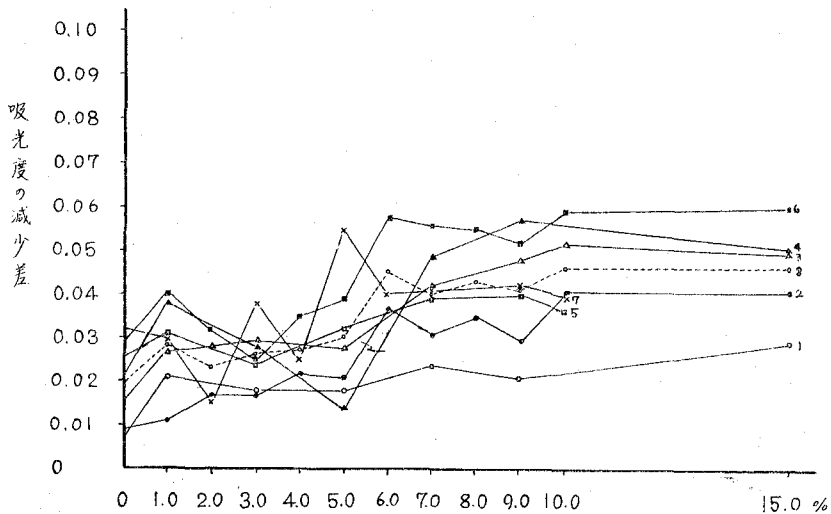
Dole<sup>28)</sup>の記載に準じて行つた。すなわちイソプロピールアルコール40, n-ヘプタン10, 1NH<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>1の割合で混和した抽出混合液をつくり, つぎに無水エチールアルコールにチモールブルーを0.01%に溶解した液を滴定混合液とする。滴定液としては0.018N. NaOH エチールアルコール液を実験ごとに用意した。

前記と同様に血漿 1.0ml, 0.2%落花生油乳剤 0.5ml, 0.15M pH6.4 磷酸緩衝液 1.5ml を混和し, 混和直後, および 37.5°C の恒温槽中におおの30分, 1時間, 2時間, 3時間, 4時間孵置した後, この被検液中より 1.0

第2表 酢酸ソーダの影響

実験番号	*酢酸ソーダ %	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15
No. 1	1	0.7	2.1		1.8		1.8		2.4		2.1		2.9
" 2	2	0.9	1.1	1.7	1.8	2.2	2.1	3.7	3.1	3.5	3.0	4.1	4.1
" 3	3	1.6	2.7	2.8	2.9		2.8		4.2		4.8	5.2	5.0
" 4	4	2.1	3.8		2.8		1.4		4.9		5.7		5.0
" 5	5	2.5	3.0		2.5		3.2		4.0		4.0	3.6	
" 6	6	3.0	4.0	3.2	2.5	3.5	3.9	5.8	5.6	5.5	5.2	5.9	6.0
" 7	7	3.2	3.0	1.5	3.8	2.5	5.5	4.0	4.1	4.0	4.2	4.0	
平均		2.0	2.8	2.3	2.6	2.7	3.0	4.5	4.0	4.3	4.1	4.6	4.6
		$\pm 0.906$	$\pm 0.917$	$\pm 0.725$	$\pm 0.640$	$\pm 0.557$	$\pm 1.307$	$\pm 0.927$	$\pm 0.985$	$\pm 0.850$	$\pm 1.164$	$\pm 0.856$	$\pm 1.041$
*平均相対力価		100	140	115	130	135	150	225	200	215	205	230	230

- \* 酢酸ソーダ%は磷酸緩衝液中に含まれる濃度。
- \* 各数字は吸光度 0.01 の減少 (孵置後) を1とした。
- \* 平均相対力価……無添加時を 100 とした時の添加時の力価の平均。



第1図 酢酸ソーダの影響

1~7 被検液の吸光度減少差 磷酸緩衝液中の酢酸ソーダ濃度  
8 平均値

第3表 酢酸カリウムの影響

実験番号		* 酢酸カリウム %											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15
No. 1	混和直後	0.265	0.270	0.265	0.262	0.263	0.266	0.260	0.260	0.261	0.258	0.265	
	60分 "	0.257	0.259	0.252	0.255	0.228	0.220	0.210	0.210	0.209	0.212	0.203	
" 2	混和直後	0.282	0.280		0.276	0.275	0.282	0.290	0.290	0.287	0.286	0.282	0.285
	60分 "	0.272	0.260		0.251	0.214	0.223	0.218	0.218	0.216	0.220	0.215	0.217
" 3	混和直後	0.288	0.288	0.281	0.290	0.292	0.282	0.289	0.285	0.280	0.282	0.288	0.290
	60分 "	0.268	0.262	0.253	0.262	0.262	0.225	0.220	0.218	0.220	0.222	0.228	0.209
" 4	混和直後	0.252	0.250	0.255	0.258	0.252	0.256	0.260	0.252	0.255	0.250	0.251	0.258
	60分 "	0.230	0.223	0.230	0.228	0.192	0.181	0.193	0.188	0.195	0.188	0.196	0.180
" 5	混和直後	0.272	0.273	0.270	0.268	0.269	0.269	0.270	0.263		0.268		0.279
	60分 "	0.242	0.245	0.240	0.258	0.220	0.248	0.208	0.195		0.204		0.210
平均	混和直後	0.271 ±0.0127	0.272 ±0.0127	0.267 ±0.0094	0.270 ±0.0114	0.270 ±0.0133	0.271 ±0.0099	0.273 ±0.0133	0.270 ±0.0148	0.270 ±0.0132	0.268 ±0.0137	0.271 ±0.0146	0.278 ±0.0122
	60分 "	0.253 ±0.0158	0.249 ±0.0147	0.243 ±0.0094	0.250 ±0.0119	0.223 ±0.0228	0.219 ±0.0216	0.209 ±0.0096	0.205 ±0.0124	0.210 ±0.0095	0.208 ±0.0124	0.210 ±0.0122	0.204 ±0.0142

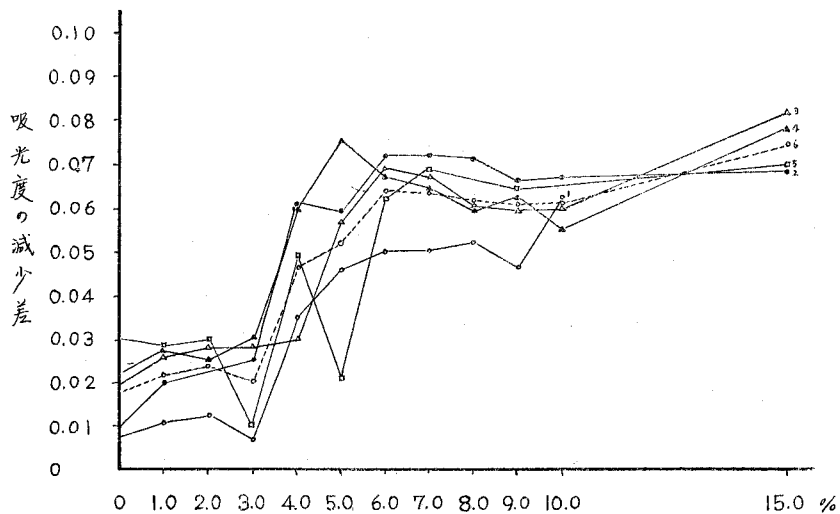
\* 酢酸カリウム%は酢酸緩衝液中に含まれる濃度。

各数字は被検液の混和直後および 37°C で 60 分静置後の吸光度。

第4表 酢酸カリウムの影響

実験番号	*酢酸カリ %	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	15
No. 1	1	0.8	1.1	1.3	0.7	3.5	4.6	5.0	5.0	5.2	4.6	6.2	
” 2	2	1.0	2.0		2.5	6.1	5.9	7.2	7.2	7.1	6.6	6.7	6.8
” 3	3	2.0	2.6	2.8	2.8	3.0	5.7	6.9	6.7	6.0	6.0	6.0	8.1
” 4	4	2.2	2.7	2.5	3.0	6.0	7.5	6.7	6.4	6.0	6.2	5.5	7.8
” 5	5	3.0	2.8	3.0	1.0	4.9	2.1	6.2	6.8		6.4		6.9
平均		1.8	2.2	2.4	2.0	4.7	5.2	6.4	6.4	6.1	6.0	6.1	7.4
		±0.810	±0.636	±0.660	±0.957	±1.266	±1.789	±0.772	±0.756	±0.676	±0.710	±0.430	±0.562
*平均相対力価		100	122	133	111	262	288	355	355	338	333	338	412

\* 酢酸カリウム%は磷酸緩衝液中に含まれる濃度。  
 各数字は吸光度の減少(孵置後) 0.01 を1とした。  
 \* 平均相対力価……無添加時を 100 とした時の添加時の力価の平均。



第2図 酢酸カリウムの影響  
 1~5 被検液の吸光度減少差 磷酸緩衝液中の酢酸カリウム濃度  
 6 平均値

ml を蓋付試験管にとり、これに抽出混合液 5.0ml を加え、混和してよく振盪し、30分間放置後蒸溜水 3.0ml, n-ヘプタン 2.0ml を加えると試験管内溶液は急速に分離運動をおこし、n-ヘプタンのみは上昇し、上層に浮んで確然と2面に分離する。上層の 3.0ml の n-ヘプタン液を別の試験管にとり、さらに滴定混合液 1.0ml をこの上加える。これを 0.018 N. NaOH エチルアルコール液で、Microburette を使用して滴定する。滴定中は酸化を防ぐために絶えず試験管内溶液を壺素でかきまぜて黄緑色の終点を判定した。なお終点判定には標準液(東

洋濾紙株式会社 B. C. G. pH 4.0~4.6) を参照として決定した。

III 実験成績

1. 酢酸塩の影響

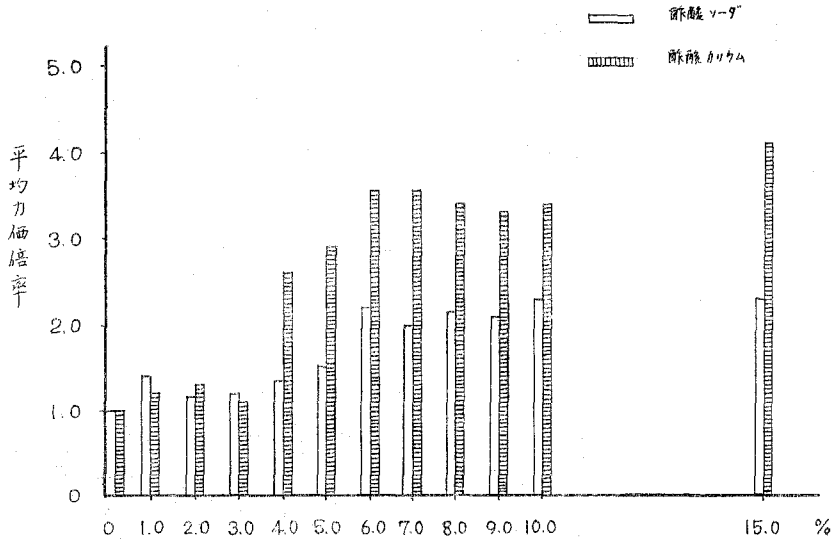
1) 酢酸ソーダ: 第1表, 第2表ならびに第1図のように添加量を増すほど明澄活性も増大する傾向が見られるが、この両者の間には直線的関係は成立せず磷酸緩衝液中の添加量が5%, すなわち 32mg/ml 以下の添加量で無添加のものに比べ、その活力の増大は50%以内であるが、6%以上添加すると、孵置後の明澄度は無添加の

時の約200%となるが、これ以上添加量を増加しても明澄度は差程増加しなかつた。これは添加量5%以内の場合も同様で、酢酸ソーダを添加すればその添加量が32mg/ml程度以内なら無添加時の50%程度、40mg/ml以上の添加では200%程度の活力増加がみられるといえよう。

2) 酢酸カリウム：この明澄活性増強の原因は酢酸基なのかナトリウムなのかを検討するため、酢酸カリウムを用い同様の実験を行つた成績を第3表、第4表および

なく、この試みは別に報告するごとく成功しなかつた。  
4) ヘパリン静注後血漿およびオリーブ油乳剤のみ懸置による吸光度の変化：0.1%のオリーブ油乳剤0.8mlの代りに蒸溜水を0.8ml入れ、これにヘパリン静注後血漿1.0ml、pH6.4、0.15M 磷酸緩衝液（酢酸ソーダ7%入）3.2mlを加え、37°Cで孵置した1時間後の吸光度の減少は0.001前後で殆んど誤差程度であつた。

次にヘパリン静注後血漿の代りに蒸溜水を1.0ml入れ、0.1%オリーブ油乳剤、磷酸緩衝液を前記同様混和



第3図 磷酸緩衝液中の酢酸濃度

第2図に掲げたが、この図表のように酢酸カリウムのほうが明澄活性度増強作用は著しく、20mg/ml添加程度で無添加時に比べ約30%以内、25mg/ml~32mg/ml(4~5%)添加で無添加時の250%~300%程度、40mg/ml前後以上の添加量では実に無添加時の350~400%の明澄活力の増大が認められた。

第3図に酢酸ソーダおよび酢酸カリウムの平均力価倍率を掲げた。

3) 酢酸ウラニウム：上記のナトリウムとカリウムは共に元素の周期律表の第1族のアルカリ金属に属し、その性質も極めて似ているゆえ、これらとまつたく性質を異にする酢酸ウラニウムを用いて同様活性度におよぼす影響を検討するため酢酸ウラニウムを用いたが、本剤は水に難溶で、水のみにては7%程度しか溶解しないため、これの7%以下の溶液と0.3Mの磷酸緩衝液とを等量加えて全量3.2mlとし、以下前と同様の操作を行つたが、極く少量でも酢酸ウラニウムが存在すると検液に沈澱を生じ、さらに磷酸緩衝液をベロナル緩衝液にかえて同様に操作しても繊維状の浮遊物が検液に生じて実験は続行できなかつた。遠心により沈澱物を除去した上清は1時間孵置を行つても全くその色調、濁濁に変化が

第5表 遊離脂肪酸の時間的経過  $\mu\text{eq/l}$

時間	混和直後	30'	1°	2°	3°	4°
実験番号						
No. 1	240	600	960	1200	1260	1260
" 2	300	420	600	960	1020	1080
" 3	300	480	960	1020	1140	1200
" 4	300	960	960	1140	1200	1260
" 5	600	960	1020	1260	1380	1440
" 6	660	840	900	960	1080	1200
" 7	660	900	1080	1080	1200	1320
" 8	720	1500	1560	1920	2040	2280
" 9	720	1560	1620	2100	2160	2280
" 10	760	1140	1220	1560	1620	1650
平均	526	936	1088	1320	1410	1497
	$\pm 202$	$\pm 340$	$\pm 292$	$\pm 385$	$\pm 381$	$\pm 337$

後操作して得た吸光度の減少は、0.005で第1表、第3

表に示されている数値は全てこれをのぞいて計算されたものである。

2. 被検液における N. E. F. A. の変化

第5表, ならびに第4図は被検液 1.0ml 当りの N. E. F. A. の増加を示したもので, 37°C で孵置 4 時間後には混和直後に比べて約 280% の増加, すなわち 526 $\mu$ eq/l ~ 1497 $\mu$ eq/l の数値を示し, 増加の割合は最初の 1 時間において著しい。なお被検液中の 脂肪乳剤の濃度は 0.33 mg/ml である。

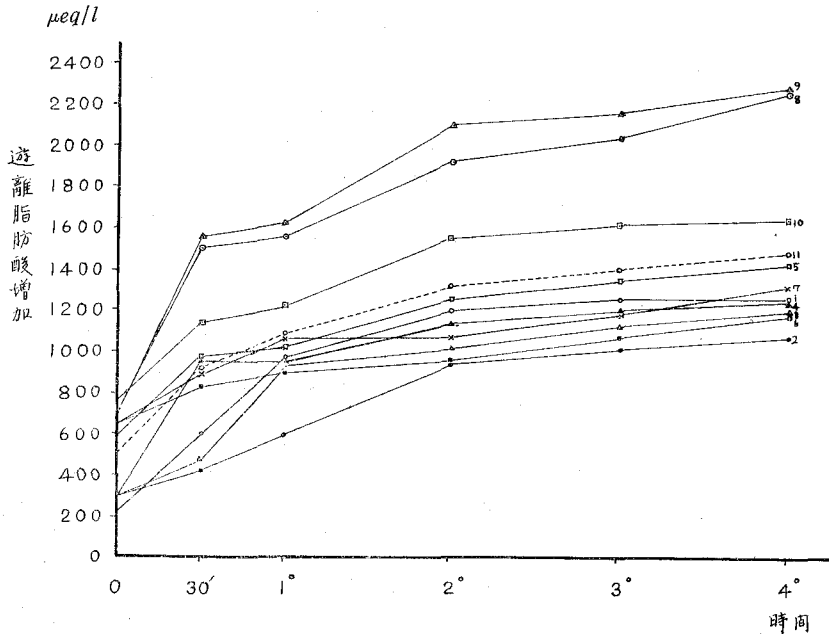
第6表は落花生油乳剤のみの N. E. F. A. を示したものである。すなわちヘパリン静注後血漿の代りに蒸留水 1.0ml, 0.2% 落花生油乳剤 0.5 ml, 0.15M pH6.4 磷酸緩衝液 1.5ml を加えて 37°C で孵置, 1.0ml 中の N. E. F. A. 値を測定したが, 表のように混和直後と 4 時間後の数値は変化なかった。

なお以上の成績を 1 括図示すると第5図のごとくなる。

落花生油乳剤とヘパリン静注後血漿を *in vitro* で孵置して生ずる N.E.F.A. の値は最初より脂肪乳剤に含まれる微量の N.E.F.A. とヘパリン静注後血漿自体が分解され産出されたものと明澄因子の作用により脂肪乳剤より遊離されたものと 3 者の合算値であろうと考えられる。したがって明澄因子の作用により脂肪乳剤より遊離したと思われる N.E.F.A. の測定値は第5表の数値より第6表, 第7表の数値を差引いたものでなければならないと考える。すなわち第8表に示したように混和直後を 0 とした時, 30分後には 296 $\mu$ eq/l, 4 時間後には 577 $\mu$ eq/l となる。

3. 被検液における吸光度の変化

第9表, 第10表には被検液の吸光度の減少, 減少差を示した。第9表の混和直後の 0.421 より 4 時間後の 0.312 と



第4図 遊離脂肪酸の時間的経過  
1~10 被検液中の遊離脂肪酸増加値  
11 平均値

第7表は同様にヘパリン静注後血漿のみの N.E.F.A. 値を掲げた。すなわち落花生油乳剤の代りに蒸留水 0.5ml を加えて同様に処置した N.E.F.A. 値である。この場合は前者と逆に 4 時間後には N.E.F.A. 値は約 240% の増加, 280 $\mu$ eq/l ~ 680 $\mu$ eq/l となった。

これはヘパリン静注後血漿中の蛋白脂質がその中に含まれる酵素の働きによって分解され, 脂肪酸が遊離したものである。増加の割合はやはり最初の 1 時間が著しく, 次第に増加の割合は弱まり 3 時間後よりは増加は認められなかった。これは多分分解さるべき蛋白脂質, トリグリセライドの量的欠乏によるものと考えられる。

第6表 落花生油乳剤のみ孵置の影響

時間	吸光度減少	吸光度減少差	遊離脂肪酸増加 $\mu$ eq/l
混和直後	0.400		240
30 分 後	0.381	0.019	240
1 時間 "	0.375	0.025	240
2 " "	0.369	0.031	240
3 " "	0.364	0.036	240
4 " "	0.350	0.050	240

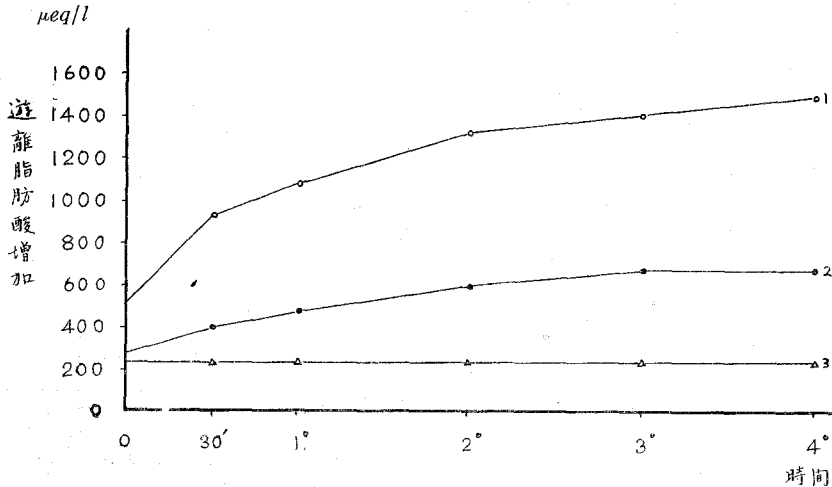
第7表 ヘパリン静注後血漿のみ貯置の影響

時間	吸光度減少	吸光度減少差	遊離脂肪酸増加 $\mu\text{eq/l}$
混和直後	0.011		280
30分後	0.005	0.006	400
1時間	0.003	0.008	480
2" "	0.002	0.009	600
3" "	0.002	0.009	680
4" "	0.002	0.009	680

血漿のみを貯置した場合にも吸光度の減少がおこり、前記 N.E.F.A. と同様な吸光度の減少についても第6図、第7図のごとき関係が生じ、これらの影響を補正すると、明澄因子による真の吸光度の減少値は第8表のごとくなる。

4. N.E.F.A. の変化と吸光度変動との関係

第8図は N.E.F.A. 増加値と吸光度の減少差との関係を示したものであり、両者について行つた実験においてその実験条件は全て同一である。図のごとく両者は殆んど平行し、双方とも最初の30分において数値ののびが著しいが、第5表における N.E.F.A. 増加値からヘパリン



第5図 各種組成貯置後の遊離脂肪酸の増加

1. 被検液中の遊離脂肪酸増加値
2. ヘパリン静注後血漿のみ貯置後の遊離脂肪酸値
3. 落花生油乳剤のみ貯置後の遊離脂肪酸値

第8表 真の遊離脂肪酸増加量ならびに吸光度の減少差

時間	吸光度減少差	遊離脂肪酸増加	吸光度減少差	遊離脂肪酸増加 $\mu\text{eq/l}$
混和直後	0	526		0
30分"	0.043	936	0.018	296
1時間"	0.059	1088	0.026	368
2" "	0.083	1320	0.043	480
3" "	0.101	1410	0.056	490
4" "	0.109	1497	0.050	577

被検液の吸光度減少差と遊離脂肪酸増加値。

脂肪乳剤、ヘパリン静注後血漿のみの吸光度減少差、遊離脂肪酸増加値を差引いて補正した数値。

吸光度の減少が明らかに認められた。すでに第6表、第7表にも掲げたごとく、脂肪乳剤およびヘパリン静注後

静注後血漿自体の N.E.F.A. 増加値 (第7表) と使用した脂肪乳剤中に最初より含まれる N.E.F.A. 値 (第6表) を差引いた数値、ならびに同様に第10表における吸光度の減少差より脂肪乳剤とヘパリン静注後血漿のみの貯置における吸光度減少差 (第6表、第7表) を差引いた数値を図示すると第9図のごとくなり、貯置2時間頃まではほぼ2者は比例するが、その後3時間に至ると吸光度の減少率の方が N.E.F.A. の増加率を上廻り、4時間目になるとこの関係は逆転するという成績となつた。

IV 考 按

Meng<sup>10)</sup> は著者と同様なヘパリン静注後の犬の血漿を用い、同様にオリーブ油乳剤明澄化に及ぼす酢酸ソーダの影響を検討し、磷酸緩衝液中の酢酸ソーダの濃度1~3%で無添加のもの200%前後、5%以上10%までの添加で無添加のもの300%程度の活力増強が見られたことを報告しているが、これを本成績と対比すると、著者の方がその活力増強度は弱いとその傾向はMeng



第9表 吸光度の減少

時間 実験番号	時間					
	混和直後	30'	1°	2°	3°	4°
No. 1	0.432	0.378	0.359	0.330	0.315	0.311
" 2	0.415	0.371	0.351	0.328	0.309	0.305
" 3	0.421	0.381	0.368	0.346	0.322	0.311
" 4	0.425	0.372	0.360	0.332	0.320	0.315
" 5	0.410	0.371	0.351	0.329	0.312	0.303
" 6	0.427	0.389	0.379	0.356	0.335	0.328
" 7	0.420	0.382	0.365	0.348	0.330	0.316
" 8	0.436	0.391	0.381	0.360	0.339	0.330
" 9	0.410	0.365	0.348	0.319	0.303	0.300
" 10	0.419	0.378	0.359	0.331	0.312	0.310
平均	0.421 ±0.0083	0.377 ±0.0079	0.362 ±0.0107	0.337 ±0.0129	0.319 ±0.0112	0.312 ±0.0094

第10表 吸光度の減少差

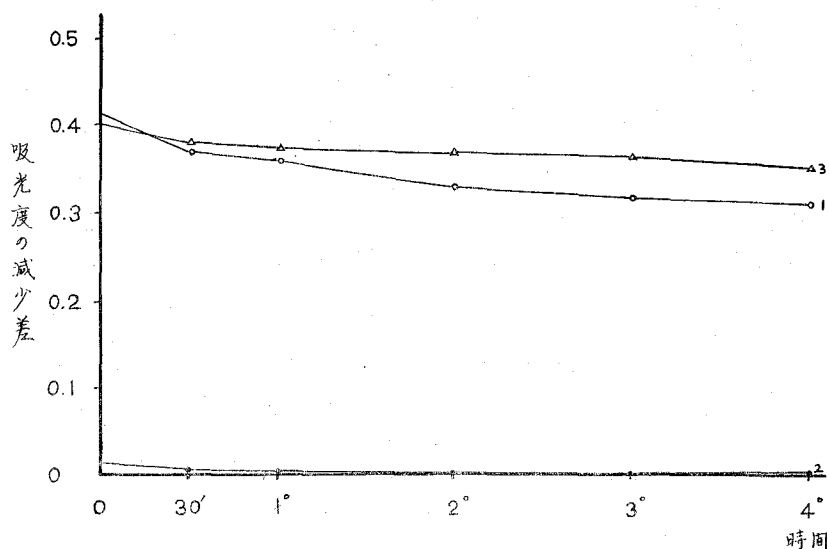
時間 実験番号	時間				
	混和後 30分	1°	2°	3°	4°
No. 1	0.054	0.073	0.102	0.117	0.121
" 2	0.044	0.064	0.087	0.106	0.110
" 3	0.040	0.053	0.075	0.099	0.110
" 4	0.053	0.065	0.093	0.105	0.115
" 5	0.039	0.059	0.081	0.098	0.107
" 6	0.038	0.048	0.071	0.092	0.099
" 7	0.038	0.055	0.072	0.090	0.104
" 8	0.045	0.055	0.076	0.097	0.106
" 9	0.045	0.062	0.091	0.107	0.110
" 10	0.041	0.060	0.088	0.107	0.109
平均	0.043 ±0.0056	0.059 ±0.0068	0.083 ±0.0097	0.101 ±0.0077	0.109 ±0.0057

の成績と同一であつた。この活性度増加率の差異は、孵置時間、および採取した血漿の明澄活力そのものが Meng のそれに比べて弱いことに起因したのではないかと考える。酢酸カリウムの影響についてはその報告例がないため、他の成績との比較はできないが、本成績の酢酸ソーダと対比してみると、むしろ好成绩を得ているのは興味ある点であり、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$  などは磷酸緩衝液中にも含まれているのであるから、この明澄作用の増強はやはり酢酸に由来するものと考えてよからう。酢酸ウラニ

ウムについては Day<sup>15)</sup> が兎を用い、本剤の 7.5 m/g kg を皮下注射した後、コレステロールを投与し、10 日後ヘパリンを静脈注射してその脂血症状況を観察し、併せて *in vitro* においてヘパリン静注後血漿に酢酸ウラニウムを 0.016% 程度添加して脂血症明澄作用の活性度を比較しているが、前者においては明澄作用は全く阻害され、後者すなわち *in vitro* においては酢酸ウラニウムは明澄作用になら影響をおよぼさなかつたと報告している。本実験には前述のように試験管内実験のみを行つたが、本剤添加により被検液に沈澱、浮遊物を生じ、その結果を確認しえなかつたが、遠心分離により沈澱、浮遊物を除去した上清には全く明澄活力の消失したことにより、この生じたものは血漿蛋白であろうと推定できる。

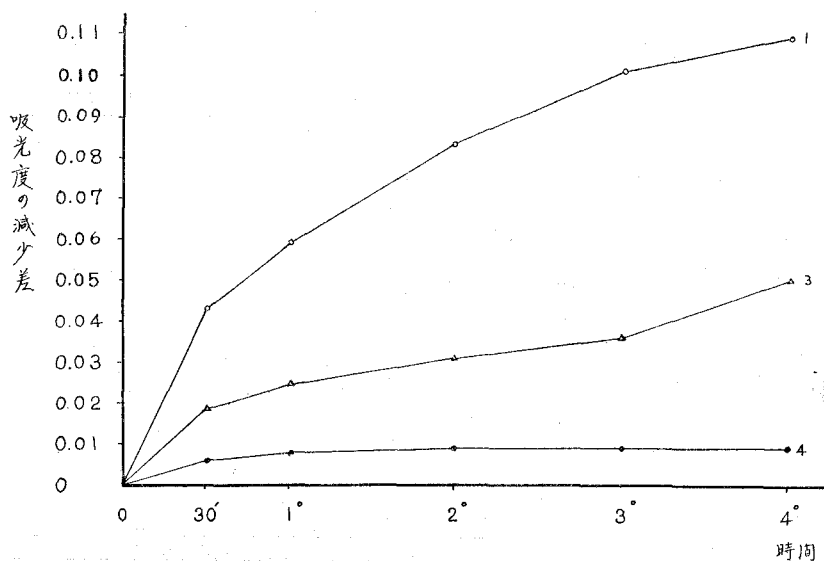
またすでに Grossman<sup>19)</sup> はねずみを用い著者と同様ヘパリン注射後血漿とココナット油乳剤を *in vitro* で孵置し、被検液の濁りの減少は 24 分後に最高となり、後数時間に亘つて徐々に上昇するが、N.E.F.A. はそれに関係なく増加し続け、6 時間後には総脂肪酸の約 35% が遊離の状態となり、明澄作用の下降は遊離された脂肪酸の量がそれを受容する血清アルブミンの能力を上廻る時におこるカルシウムソーブの形成によるものであるとの成績から、脂肪酸の遊離を伴う脂肪分解がヘパリンによる明澄作用の根本的な原因であるか、または附随的な結果であるかにつ<sup>14)</sup> 29) いて、脂肪分解が明澄現象の根本的な機構であるとしている。

著者の成績は第 9 図のごとく、吸光度の減少差は孵置後 3 時間が最高で以後減少し、N.E.F.A. の増加は 2 時



第6図 各種組成静置後の吸光度減少値

1. 被検液の吸光度減少
2. ヘパリン静注後血漿のみ静置後の吸光度減少
3. 落花生油乳剤のみ静置後の吸光度減少



第7図 各種組成静置後の吸光度減少差の時間的経過

1. 被検液の吸光度減少差
2. ヘパリン静注後血漿のみ静置後の吸光度減少差
3. 落花生油乳剤のみ静置後の吸光度減少差

間では飽和に達し、その後は漸増し、4時間後には脂肪乳剤中の総脂肪酸の約25%が遊離の状態となったが、

(遊離脂肪酸%はオレイン酸および1部はラウリン酸として計算<sup>30)</sup>した)この成績の相違は、実験材料、方法などの相違もさることながらGrossmanらは著者のごとく血漿および脂肪乳剤のみの静置による影響を観察しておらず、これらの補正を行わなければ見掛けのN.E.F.A.

の増加や、吸光度の減少は著しく現実とかけはなれた経過をたどることは第5図ならびに第8図の成績からも明らかである。ことに第6表の落花生油乳剤のみ静置のごときは吸光度の減少値は相当大であるが、酢酸塩の影響の実験においてオリーブ油乳剤のみ静置して1時間後の吸光度の減少差が0.005に過ぎぬのと比較して興味があり、これは恐らく使用する中性脂肪乳剤の種類、濃度、

純度等が植物性油脂の溶解化に関係してかくのごとき相違が生れたのであろう。

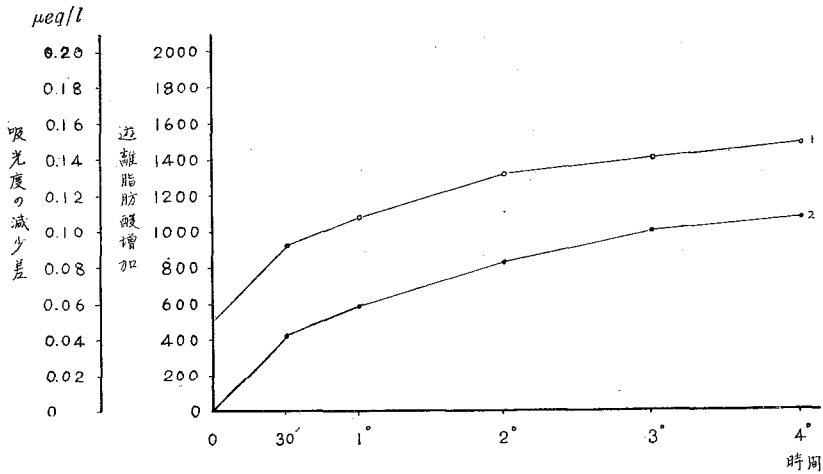
Shore 14) のヘパリン静注後の人血漿と卵黄の蛋白脂質を in vitro で孵置して N.E.F.A. の増加を観察した実験, Nichols 15) 16), Robinson 20), Zöllner 22) のほぼ同様な実験等もいずれもこの補正を行つておらず, このためこれら多くの報告はその総括的経過は参考になるが, 個々のデータの数値は真の明澄活性度の指数とはならない。

ヘパリンの脂血症明澄化の作用機序に関してはすでに多くの 3) 24) 31(〜35) 報告があり, すでに篠崎<sup>36)</sup>も本誌上に多数の文献をひいた報告を行つており, またこの明澄

作用の in vitro の実験も既述のごとく相当数の報告がなされているが, それらの実験はいずれもすでに述べたごとくヘパリン静注後血漿および使用乳剤のみをおのおの単独孵置する時, 孵置により相当量の N.E.F.A. の増加と吸光度の減少という現象が生ずることを見落しており, 本実験はかような現象の発見に大きな意義のあるものと確信すると共に明澄因子の作用機序は極めて複雑であり, 今後解決さるべき多くの問題を含んでいるものと考える。

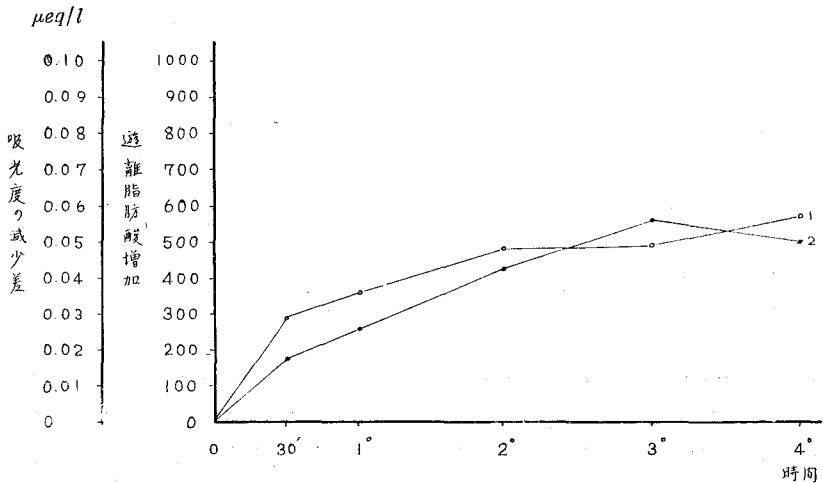
V 総 括

1. ヘパリン静注後の犬血漿のオリブ油乳剤明澄化におよぼす酢酸塩の影響を検討し次の成績を得た。



第8図 遊離脂肪酸の増加と吸光度減少差との関係

1. 被検液の遊離脂肪酸増加
2. 被検液吸光度減少差



第9図 真の遊離脂肪酸増加と吸光度減少差との関係

1. 遊離脂肪酸の増加
2. 吸光度の減少差

1) 酢酸ソーダ, 酢酸カリウムの添加は共に明澄作用を増強しますが, その傾向は前者に比べて後者の方が著しく, かつ両者とも 38mg/ml 以上添加しても増強率は上昇せず, この増強率はナトリウムで無添加時の約200%, カリウムで約350%であった。

2) この結果から明澄作用増強の作用物質はナトリウムやカリウムでなく酢酸であろうと推定した。

3) 酢酸ウラニウムを検液に添加すると, 検液中に沈澱を生じ, この沈澱を遠心分離により除いた上清には明澄活力は認められない。ゆえに添加により生じた沈澱は血漿中の蛋白であろうと推定した。

2. ヘパリン静注後の犬血漿と落花生油乳剤を *in vitro* で4時間37°Cで孵置し, 脂肪乳剤の明澄化, および N.E.F.A. の変化を観察し次の成績を得た。

1) 脂肪乳剤の明澄化および N.E.F.A. の増加が認められた。

2) 両者の反応はほぼ平行しているが, 明澄化は3時間後には最高に達し, 後下降に向うのに反してN.E.F.A. は引続いて増加の傾向を辿り, 4時間後には脂肪乳剤中の総脂肪酸の約25%が遊離し, 本実験状況の下で孵置3時間目の吸光度の減少差は約0.056を示した。

3) 使用する脂肪乳剤の種類, 濃度, 純度により, 吸光度の減少度および N.E.F.A. の測定値に相違が生ずるのでこれを補正することが必要である。

稿を終るに当たり終始御懇切な御指導と御校閲を賜った寰島教授に深謝し, 実験を御指導頂いた当教室小峰助手御助言を頂いた本生化学松村教授, 松村講師, 日本畜産大学大条教授, 脂肪濃度測定に御便宜を頂いた森永乳業中央研究所の前野所長, 両木課長および実験に協力頂いた野原, 勅使河原両学姉に深く感謝の意を表します。

#### 文 献

- 1) Hahn, P.F. : Science, 98 19 (1943)
- 2) Anfinsen, C. B. & Quigley, T. W. : Circulation, 8 435 (1953)
- 3) Brown, R. K., Boyle, E. & Anfinsen, C.B. : J. Biol. Chem., 204 423 (1953)
- 4) Nikkilä, E.A. : Scand. J. Clin. & Lab. Invest., 5 : Suppl. 8 (1953)
- 5) Hood, B., Angerwall, G., Isaksson, B. & Welin, G. : Scand. J. Clin. & Lab. Invest., 6 1 (1954)
- 6) Hollet, C. & Meng, H.C. : Biochem. Biophys. Acta., 20 421 (1956)
- 7) Nikkilä, E.A. : Biochem. Biophys. Acta., 27 612 (1958)
- 8) 田中茂保 : 通信医学 9 1072 (昭 32)
- 9) 勅使河原弘 : 東女医大誌 30 535 (昭 35)
- 10) Meng, H. C., Hollet, C. & Cole, W. E. : Am. J. Physiol., 179 314 (1954)
- 11) Korn, E.D. : J. Biol. Chem., 215 1 (1955)
- 12) Somer, P.D., Bosch, J. & Jossens, J. V. : Nature, 182 59 (1958)
- 13) Day, A.J. & Peters, J. A. : Austral. J. Exp. Biol. Med. Sci., 36(1) 39 (1957)
- 14) Shore, B., Nichols, A.V. & Freeman, N.K. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 83 216 (1953)
- 15) Shore, B. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 88 73 (1955)
- 16) Nichols, A.V., Freeman, N.K., Shore, B. & Rubin, L. : Circulation, 6 457 (1952)
- 17) Nichols, A.V., Rubin, L. & Lindgren, F. T. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 85 352 (1954)
- 18) Grossman, M.I., Palm, L., Becker, G.H. & Moeller, H.C. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 87 312 (1954)
- 19) Grossman, M.I., Stadler, J., Cushing, A. & Pajm, L. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 88 132 (1955)
- 20) Robinson, D.S. & French, J.E. : Quart. J. Exp. Physiol., 38 233 (1953)
- 21) Lindgren, F.T., Freeman, N.K. & Graham, D. M. : Circulation, 6 474 (1952)
- 22) Zöllner, N.u. Frings, H.D. : Z. Exp. Med., 127 578 (1956)
- 23) Grossman, M.I., Moeller, H.C., Palm, L. & McDaniel, R. : Fed. Proc., 14 65 (1955)
- 24) Borgström, B. & Carlson, L.A. : Biochem. Biophys. Acta. 24 638 (1957)
- 25) Davis, B.D. & Dubos, R.J. : Arch. Biochem., 11 201 (1946)
- 26) Gordon, R. S., Boyle, E., Brown, R. K., Cherkes, A. & Anfinsen, C.B. : Proc. Soc. Exp. Biol. & Med., 84 168 (1953)
- 27) 稲場明德 : 北海道医誌, 33 333 (昭 33)
- 28) Dole, V.P. : J. Clin. Invest., 35 150 (1956)
- 29) Levy, S.W. & Swank, R.L. : Am. J. Physiol., 123 301 (1954)
- 30) 土屋知太郎 : 実用油脂便覧, 工業図書出版, 東京 昭 15 89
- 31) Graham, D.M. et al : Circulation, 4 666 (1951)
- 32) Engelberg, H. : J. Biol. Chem., 222 601 (1956)
- 33) Anfinsen, C.B., Boyle, E. & Brown, R.K. : Science, 115 583 (1952)
- 34) 大野公吉 : 坂上利夫 : 内科最近の進歩,

医歯薬出版, 東京 昭 33 91

Med., 99 489 (1958)

35) **Engelberg, H.** : Proc. Soc. Exp. Biol. &

36) 篠崎正典 : 東女医大誌, 29 667 (昭 34)