

血清アルブミンに於ける個体特異性分層の有無に関する実験的研究

〔第2篇〕 血清蛋白分割法に関する検討

京都大学結核研究所外科療法部 (主任 教授 長石 忠三)

馬 渡 誠

目 次

緒 言	
第1章 血清アルブミンの分割法	
第1節 各種血清蛋白分割法に関する文献的考察	
第2節 塩析法による血清アルブミンの分割	
第1項 実験材料並びに実験方法	
第2項 実験成績	
第3項 小 括	
第2章 塩析法により分割された血清アルブミンの変性の有無に関する実験	
第1節 電気泳動より見た変性の有無	
第1項 実験材料並びに実験方法	
第2項 実験成績	
第3項 小 括	
第2節 ビウレット反応より見た変性の有無	
第1項 実験材料並びに実験方法	
第2項 実験成績	
第3項 小 括	
第3節 生体反応より見た変性の有無についての検討	
第1項 実験材料並びに実験方法	
第2項 実験成績	
第3項 小 括	
第3章 綜括並びに考按	
結 論	

緒 言

第1篇に於いて、著者は瀉血並びに輸血が血清蛋白濃度並びにその分割に及ぼす影響に就いて動物実験を行い、小笠原の得た知見の再検討及び補足を行うことにより、小笠原と同様な次の結論を得ることが出来た。

即ち、大量瀉血後の血清蛋白濃度の減少は如何に適量の保存血輸血を行つても補填し得ず、

しかもその際の血清蛋白の減少がアルブミン劃分の減少に基因していること、及び自家血輸血によれば血清蛋白の減少を防止し得ることよりアルブミン分割には個体特異性分層が存在するのではないかと推定されること等である。

扨、アルブミン分割の個体特異性を追求するに当つては、先ず、アルブミン劃分の分離を行う必要がある。そこで、本篇では血清蛋白の分割法並びにそれに伴う変性の有無について検討を行なつた。

第1章 血清アルブミンの分割法

第1節 各種血清蛋白分割法に関する文献的考察

血漿蛋白質に就いては1938年 Tiselius によつて電気泳動法が行われる以前より種々の研究が行われていたが、Tiselius の電気泳動法出現により新時代を画するに到るとともに、他の分割法も一段と進歩したのである。今日行われている血漿蛋白分割法を分類すると次のようになる。

1) 溶媒に対する溶解度の差を利用する方法；これには溶媒として塩類溶液を利用する方法、pH によつて溶解度の異なる現象を利用する方法等がある。

2) 蛋白質の分子量の差による沈降速度の差を利用する方法；Sverdberg²³⁾ 一派により完成された超遠心法である。

3) 免疫学的特異性の差を利用する方法；蛋

白質の抗原性が各分割によつて特異性を有している点を利用する方法である。

4) 電場に於ける蛋白質の易動性の差を利用する方法；即ち、電気泳動法である。

以上4法のうち、本節では一般に用いられており、しかも著者の目的の一つである大量にアルブミン分割を分離するといった意味で塩析法が最も適していると思われたので、これについて簡単に述べる。

A) 硫酸法；これは最も古くから用いられている方法で、強い塩析力と高い溶解度を有し、しかも温度による溶解度の差が少い。更に今一つの利点として得られたアルブミン分割が電気泳動的にも、又超遠心分析的にも比較的均一な成分であるということがある。

B) 硫酸ソーダ法；塩析効果は硫酸より大であること、窒素分析の出来ること、及び硫酸より毒性が少ないこと等があげられるが、一方その溶解度が低い点及び変性防止のために低温度で操作する場合、溶解度の低下を来すため、著者の目的にはそわない。

C) 磷酸塩法；本法は硫酸法及び硫酸ソーダ法に比較して pH を自由に調節出来、又緩衝作用があるので pH を一定に保つことが出来るという利点があるが、塩析力が劣り、しかも塩析の結果得られたものの純度が低いという欠点を有する。

以上、硫酸法、硫酸ソーダ法及び磷酸塩につきその各々の長所及び短所をあげてみた。

一般に適当な塩の存在は蛋白質の変性を抑制するといわれ、殊に SO_4^{2-} ¹⁸⁾ にはこの作用が強いようである。しかも手頃で比較的簡単に操作出来ることから、著者の目的に沿うものとして硫酸法を採用し、以下の実験を行つた。

第2節 塩析法による血清アルブミンの分割

第1項 実験材料並びに実験方法

実験材料；正常雑種成犬を用いた。採血はラボナールを静脈注射して麻酔し、股動脈より行い血液の凝固阻止のためヘパリンを使用した。採血した血液は2,000回転、30分遠沈を行い、血漿を分離して実験に供した。

実験方法；上記の血漿に硫酸を使用して塩析を行い、

アルブミンを分離した。即ち、硫酸を少量ずつ加えながら充分攪拌振盪して硫酸を加えた際、局所的に高濃度となるのを防ぎつつ、この操作を硫酸の濃度が各々27%、30%及び32%となる迄行いグロブリンの沈澱を計った。

温度は変性を防止するため5°Cに保つように注意し、以上の方法で分割したアルブミンを氷室でNo.400セロファンで生食水を外液として頻回に交換しながら透析し、電気泳動法によりそれらの純度を検討した。電気泳動装置はTiseliusの装置を用い条件は第1篇に準じた。

第2項 実験成績

以上述べた実験方法によつて得た実験成績について述べると、硫酸濃度が27%では、 α グロブリンがアルブミン量の約10%含まれている。併し、硫酸濃度を30%にするとグロブリンの混入率は約5%となる。32%以上の硫酸を用いるとアルブミンの沈澱が始まる。

第3項 小 括

以上血漿蛋白の分離法、更には一般に用いられている各種塩析法の長短所を説明し、著者が如何なる理由で硫酸法を採用したかを第1節で述べた。第2節では硫酸法により分割されたアルブミンに就いて、その純度を電気泳動的に検討した結果、本アルブミン分割は5%程度の α グロブリンの混入をみるのみであることを知つた。

第2章 塩析法による血清アルブミンの変性に関する検討

著者は前節で記述したように、蛋白分割の方法を比較的大量にしかも手頃な方法である硫酸法に求めたが、 SO_4^{2-} は変性を抑制するという報告があつても、未だ定説ではなく、分離されたアルブミン及びグロブリンが果して生物学的にも物理化学的にも変性を来していないかを検討する必要があるので、電氣的性質及び化学的性質を利用して変性の度合を検討し、併せて生体注入後の変化をも観察した。

第1節 分割の電気泳動像よりみた変性の有無

第1項 実験材料並びに実験方法

実験材料は前章に述べた硫酸法により硫酸濃度を約

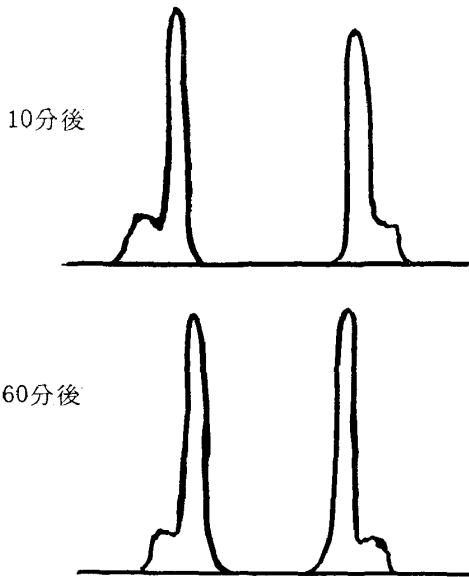
30%となし、グロブリンを塩析した残りの上清を使用した。

実験方法；塩析法により得られたアルブミン分割中には可成の硫安が含有されているので、4°Cの氷室に於いて No.400 のセロファンを使用、外液を生食水として頻回に交換してそれを除去した。しかる後これを2分して、pH4.8 クエン酸リン酸緩衝液で透析し、後半分を孵卵器内に3日放置後同様のpHで透析し電気泳動に供した。

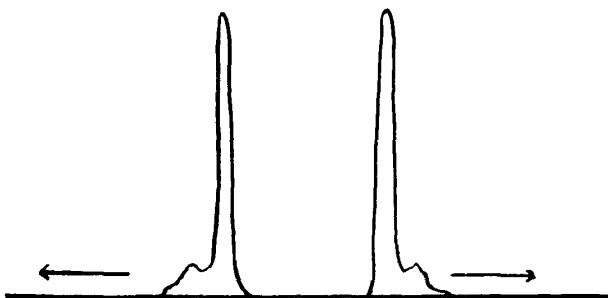
第2項 実験成績

塩析直後のアルブミンは第6図に示すように電気を負荷するも動かず、1時間にしてわずかに中央部に移動するのみである。

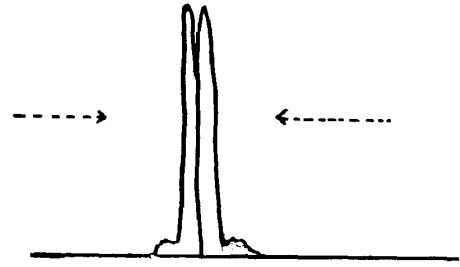
一方多少混在せるαグロブリンは第7図の如くそれぞれ現われるが、等電点がpH5.06で外液のpHが4.8のリン酸クエン酸緩衝液のためαグロブリンは(+)に荷電し(-)へ移動、時間を追うに従つて泳動して行くので、アルブミン像が鮮明となる。一方孵卵器内に放置し完全



第6図 pH4.8により塩析直後のアルブミン像



第7図 泳動10分後



第8図 泳動20分後

に変性せしめたアルブミンを泳動すると第8図のように移動を開始し20分にして、ピントガラス上では中央部で重り合つてしまう。

第3項 小 括

塩析により得られたアルブミン分割がその操作中に変性を来たしているか否かを、その電気泳動的性質を利用し、電気泳動法で検討してみた。その結果電気泳動像よりみるならば、低温で硫安法により得られたアルブミン分割は、その電気的性質には変化を来たさないが37°Cの孵卵器中に3日間放置し、対象としたものでは明らかにその泳動像に変化を来たすことを認めた。

第2節 弱アルカリ性ビウレット反応での検討

第1項 実験材料並びに実験方法

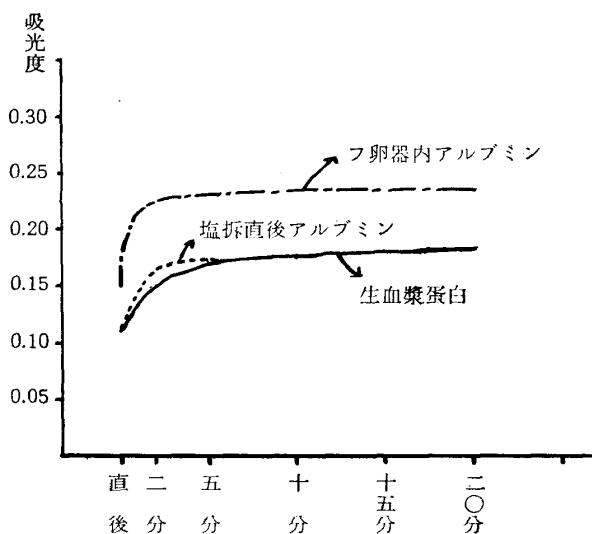
実験材料は前節と同様に硫安法により得られたアルブミン分割で、これを十分に透析、完全に硫安を除去した後に実験に供した。

実験方法；弱アルカリビウレット反応は荒谷²⁾が報告している蛋白変性測定法で炭酸ソーダの弱アルカリ性を応用した方法に準じた。ビウレット反応の試薬は第6表の通りである。塩析直後のアルブミン、及び孵卵器内に3日放置後のアルブミンを1%の濃度になるよう稀釈し、これにビウレット試薬を加えてから2分、5分、10分、15分、20分と経時的にビウレット反応を行い、その変化を光電比色計(波長560)で吸光度を以て測定した。

第2項 実験成績

新鮮な血漿のビウレット反応は第9図に示すようにその反応速度は極めて緩慢である。

硫安法により得られたアルブミン分割液のビウレット反応の曲線は僅かの増加を示すが、殆んど新鮮血漿のそれと平行している。一方孵卵器内に3日放置し、高度の変性が招来されてい



第9図 弱 Alkali 性 Biuret 反応

と思われるアルブミンはすでに外見上でも多少の変化を来しており、試薬を加えた直後の反応でも生血漿の状態をはるかにオーバーしており、5分で更に変化の度合を大きくし、曲線に明らかな相違が認められた。

第3項 小 括

塩析法（硫酸法）で得られたアルブミン割分の変性度をビウレット反応により検討し、次の結果を得た。

即ち、冷室に於いて操作したアルブミン割分の反応曲線は、新鮮血漿のビウレット反応曲線とほぼ平行するので、変性は来たしてはいないと思われる。37°C 孵卵器に放置した対照の割分とは明らかに相違した反応曲線を示す。

第3節 生体反応よりみた変性の有無

第1項 実験材料並びに実験方法

実験動物には正常な雑種成犬を用い、注入したアルブミン割分液は前節と同様塩析して分離した直後のものと、それに孵卵器内に3日間放置せるものを用い、10cc/kg の割合で注入した。この濃度は1.5~2%である。注入後は10分、50分、3時間と経時的に電気泳動法並びにビウレット反応によりその蛋白濃度、割分及び変性の有無を追究した。

第2項 実験成績

電気泳動法では新鮮（塩析直後）アルブミン割分輸注群及び変性アルブミン割分輸注群では、両者とも注入後第6表、第7表に示すように

第6a表 弱アルカリ性ビウレット試薬

R. P	Na ₂ CO ₃	1.0
	Cu SO ₄	0.3
	KJ	0.5
	酒石酸 K. Na	0.9
	H ₂ O ad	100.0

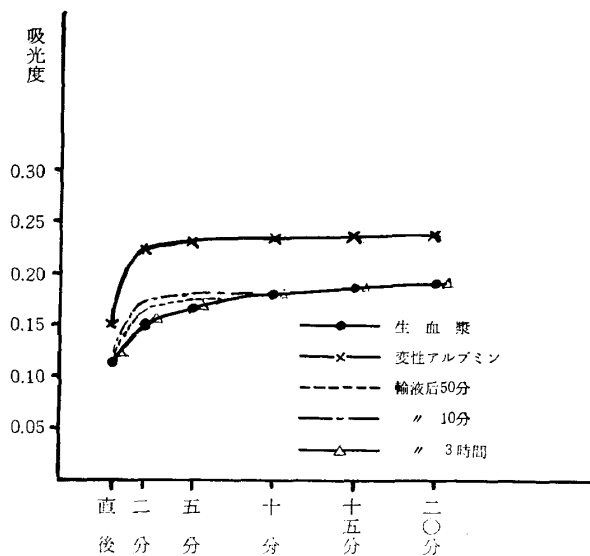
第6b表 塩析直後アルブミン輸液後の分割変動

	Al	α ₁	α ₂	β	γ	A/G
輸液前	53.2	3.2	4.9	19.3	21.3	1.15
輸液後10分	56.5	4.2	4.8	11.5	22.2	1.3
〃 50分	55.3	3.9	3.3	16.4	20.3	1.25
〃 3時間	54	3.5	5.0	18.5	19.0	1.17

第7表 変性アルブミン輸液後の分割変動

	Al	α ₁	α ₂	β	γ	A/G
輸液前	49.8	4.1	5.1	19.0	22.0	0.99
輸液後10分	52.3	5.1	5.0	16.6	21.0	1.09
〃 50分	53.0	5.0	5.1	15.3	21.5	1.13
〃 3時間	52.5	4.5	4.8	17.0	21.2	1.11

10分にしてアルブミン濃度の上昇がみられ、この上昇傾向はその後3時間以上続いている。ビウレット反応では輸注前の変性アルブミンと、輸注前の新鮮血漿では明らかな相違がみられるが、この変性アルブミン輸注後の経時的吸光度をみると第10図に示すように、輸注10分後、採血した血漿にビウレット試薬添加後、2分、5分にして有意の差がみられる。しかし試薬添加



第10図 変性アルブミン輸液後の Biuret 反応

直後では新鮮血漿と殆ど同じ吸光度を示している。50分後採血したものはやや緩慢なカーブを辿り、3時間後採血したものは殆んど変化をみない。

第3項 小 括

塩析法により得たアルブミン分割液を生体内に輸注し、その生体に及ぼす影響を蛋白濃度、その分割及びビウレット反応にて追求し次の結果を得た。

即ち、冷室で塩析操作したアルブミン分割液を生体内に輸液した場合ビウレット反応では何等の変化もみられなかつた。しかし変性アルブミン分割液の場合は明らかな吸光度の差を生じた。又、電気泳動的には塩析直後のアルブミン分割液により、アルブミン分割の増加を認められた。一方変性アルブミン分割液後の蛋白濃度並びに分割の変動は、塩析直後の新鮮アルブミンと変性アルブミンとの間に有意の差を認めなかつた。

第4章 総括並びに考按

以上述べた処を総括しながら考按を加えてみる。

先ず血清蛋白の分割法についてみると、塩析法、超遠心法、電気泳動法があり、又特殊な方法としては免疫血清学的方法の4種類が代表的なものであり、そのうちで最も一般的に用いられているものが塩析法と電気泳動法である。

塩析法には硫酸法、硫酸ソーダ法及び燐酸塩法等があり、又近時では Cohn⁶⁾ によるエタノール分割が盛んに用いられるようになった。

それ等のうち、大量血漿を分割するにはエタノール分割は能率的でもあり、且つ分割の純度が比較的高いので、より望ましい方法ではあるが、操作が複雑であるという理由で、一般的には採用し難い。それに対し塩析法は一定の条件の下に操作するならば比較的簡単に純度の高い分割が得られる。著者は上記各方法を比較検討した結果、硫酸法を採用した。硫酸法により得られたアルブミン分割液を電気泳動像から検討してみると、硫酸の濃度を30%前後にすることにより、 α グロブリンがアルブミンの約5%程度

含まれるのみで、純度が比較的に高いものが得られる。元来アルブミンと α グロブリンは電気泳動的にもしばしば連続しているもので、物理化学的性状からも殆んど同じであり、これを完全に分離することは塩析法では殆んど不可能と考えられるので、この実験で得られたアルブミン分割液に5%程度の α グロブリンの混入があつても止むをえないと考えられる。

更に塩析操作時の変性をアルブミン分割の電気的性質及び化学的結合状態から検討してみた。蛋白質は NH_2 と COOH の両基のバランスの下に各々特有の等電点を有している。従つて今、pH4.8というアルブミンの等電点のpHでのクエン酸燐酸緩衝液を用いて泳動する時、仮に変性を来していたとすれば陽、陰何れかへの荷電を生じていると考えて大過ないと思われるので、それに相応した反対極へ向つて泳動する筈である。

第2章に於ける実験成績からみると、塩析直後のアルブミンは殆んど泳動しないが、孵卵器内放置アルブミンは電流を負荷すると、陽極へ泳動してゆき、像は約20分後には重り合つてしまう。このことは NH_2 と COOH の荷電のバランスがくずれ、アルブミンは孵卵器内放置によりpH4.8の状態では(-)の荷電を示し、すべて等電点は若干酸性側の方に移行していると考えられる。 α グロブリンはpH5.06が等電点といわれているが、孵卵器内放置によりアルブミンと共に若干酸性側の方へ移行していると推定される。しかしpH4.8では陽に荷電して陰極へ泳動していることからこの等電点は、5.06から4.8の間にあることは確かである。このことからもし孵卵器内放置により、アルブミンが α グロブリンと同じ程度に移行したとするならば、pH4.8から酸性側に0.26の範囲で移行したと考えられる。因みにpH4.6のクエン酸燐酸緩衝液にて電気泳動を行うと、20分経つても泳動しない。

以上の事からアルブミンの変性状態に於ける等電点の移動が変性への証明となり得る事からして、塩析直後のアルブミンは電気泳動的にみても変性をおこしていないと思われる。

変性を定義するという事は極めて難しい問題であるが、著者は Wu³⁹⁾ と同様な見解をもっている。即ち、蛋白質の結合を立体的な構造と解釈し、ペプチッド鎖が緊密に折りたたまれて一定の形状に固定されているが、種々な作用で二次的な結合がきれて折りたたまれたペプチッド鎖がほぐれて、生の時の一定の規則正しい形状からもつと乱雑なものに変るような現象である。塩析直後のアルブミンを主体に輸血した場合には、その吸光度からするビウレット反応では殆んど変化はないが、生理的副作用を現わさない程度の変性アルブミンを輸液した場合、採血した血漿にビウレット反応試薬添加後の吸光度に変化をうけていない事は、生体内で変性アルブミンが体液で稀釈されるためか、或いは体内特に肝の酵素により生蛋白への回復が図られるかいずれかであると解釈される。しかしビウレット試薬添加後2～5分の間には、多少の吸光度の増加をみることから、塩析直後のアルブミンに比べて依然として変性し易い状態におかれていると考えられる。これらから考えるに生理的副作用の起らない程度の変性アルブミンを輸血した場合には、二次的なH結合が容易にもどり、もとの立体構造に復し易いことが考えられる。変性アルブミン輸血後3時間を経た血漿は、ビウレット反応での吸光度は完全に生の状態に復していることから体内に注入された変性アルブミンは比較的短時間で元の状態に戻り、再生も簡単に行われるのではなかろうか。

まして等電点のかわらないしかもビウレット反応でも殆んど変化のみられない状態にある塩析直後のアルブミンを注入した場合は、ほぼ完全なる生蛋白の状態にあると解される。多少変性されたアルブミンですら輸血後の蛋白濃度及びそれらの分割には生蛋白輸液後1～3時間では有意の差を認めないことから、塩析後のアルブミンが何等実験に支障のないことがうかがえる。しかしこれのみにて変性の解釈がなされたわけではなく、今後研究の余地が充分にある。

結 論

各種血漿蛋白分割法を比較検討し、更にそれにより得た劃分の変性の有無を検討し次の結論を得た。

1) 硫酸による塩析法は比較的大量の血漿蛋白を分離するには操作が簡単であり、しかも得られた劃分の純度が比較的高いことより、実験に利用するには簡便にして分離しやすい方法である。

2) 更に塩析法により得られたアルブミン劃分につき電氣的性状、化学的性状、及び生体反応の各面より検討を加えてみるに、その性状の変化を認めなかつた。

3) 以上より硫酸法により得られたアルブミン劃分は殆んど変性を来たしていないと考えられる。