

4. 血清蛋白の「アルカリ」變性に關する 「ポーラログラフ」的研究 (第4報)

血清蛋白分割との關係について

笹井外喜雄・江川昌男・宇佐美弘

Polarographic Studies on the Alkaline Denaturation of the Serum Protein. (IV). The Relationship between the Serum-protein-wave and their Fractions

Takio Sasai, Masao Egawa and Hiroshi Usami

(Inouye Laboratory)

Why the sera of cancer, inflammatory disease and hepatic disease show the lower wave than normal? As already explained repeatedly in the previous reports, one of the factors for this phenomenon is due to the decreased content of serum protein accompanied with the disease. In the last report the clinical correlation of wave height to the A/G ratio was discussed.

The clinical investigation was continued by the following modified method. In order to avoid the quantitative factor, each serum, containing different amount of protein, was adjusted to the definite concentration in the final cobaltous mixture (0,15%), using the procedure of CuSO_4 gravimetric method. Further, the temperature in the experiments was always kept constant (16°C). Comparing the wave-height obtained with the value of A/G ratio, we found that at least in the liver disease the relationship between these two values was very intimate, especially so far as the denaturated sera were concerned (Table I). In order to ascertain this results, we analysed the protein fractions, which had been isolated by various methods, such as those of ethanol-fractionation in -5°C or of the salting-out by Na_2SO_4 , and further the albumin crystal of horse serum (Mc. Meekin). With these samples, the relation of the wave-height to its protein concentration was studied both in natural and in denaturated states.

As seen from Fig. I and 2, the albumin revealed higher wave than the

globulin and when denaturated, the wave from albumin became very high, whereas the wave from globulin showed almost the same. The wave-forms were also characteristic to the nature of proteins, i. e. to the facts that either the fraction is albumin or globulin, the state is natural or denaturated, and the origin is human or horse (Fig. 3).

From these facts it became apparent that the wave from the serum protein showed a combined wave of albumin and globulin, so that polarographic test for serum protein (the first reaction of Brdička or the digest test of O.H. Müller) represents essentially the test in regard to the A/G ratio.

一定量の血漿又は血清から得られる「ポーログラフ」蛋白波(以下單に蛋白波と記す)が、癌疾患をはじめ炎症性疾患、更に就中肝臓疾患に於て健康血清に比し著明に低い事實は「ブランク」癌反應(その第一反應)として多くの追試をうけ私達も充分その眞實性(但し非特異的である)を認め得たものである。では一体何が故にこの様に低い波を呈するのか? 既に前報告で繰返し述べた様に、本現象の原因の一部は皆該疾患に必然的に伴う血清蛋白濃度の低さに依るものであるが、本質的な要因は矢張り血清蛋白の質的變化に基くもので、特に¹⁾²⁾ Albumin/Globulin 比との相關性を臨床的觀察から推論した。³⁾

今回はこの問題を一層確實にするため下記の變法に依つて臨床觀察をしたことと、更に血清蛋白の個々の成分蛋白を種々の方法で分離したものについて、波高及び波形を目標に分析的検討を加えた。

(1) 新變法に依る臨床觀察 (Table I)

個々の材料による血清蛋白量の差を補正するために、豫め硫酸銅比重法によつて蛋白量を測定し、之に對し適量な量の試験液(一定のコバルトのアムモニア緩衝液)を加えることに依り蛋白の終局濃度を一定になる様にした(0.0134%)。又豫備實驗で「ボ」誤差のうち一番重要なるものが溫度恒數であり、且つ溫度に依つて「アルカリ」變性は或は一相性變化をなし或は二相性變化をなす事實がある²⁾ので一相性變化に止る一定溫度(16°C)を實驗條件として守つた。

亦 Kjeldahl 法に依る A/G 比は同一血清材料を用いて測定した。

この様にして得た「ボ」蛋白波高と A/G との關係は Table I に示された様に、少くとも肝臓疾患に於ては殆んど完全に平行している。特に「アルカリ」變性した蛋白波波高とよく一致した。然し第 3 報で觀察した血液病の場合の様に、ここでも例えば急性腎炎の 2 例の觀察例はこの關係が曖昧であつた。更に血清分割沈澱に用いる Na_2SO_4 の濃度との關係も數例で追求したが 22%法(How)と 28%法(Majoor)とでは決定的な差を表わしていない。

Table I. A/G Ratio and Height of Protein-Wave in Diseases.

NAME	DISEASE	Pol. Prot. wave mm(1/200)		A/G	
		native	denatur.	Na ₂ SO ₄ 22%	Na ₂ SO ₄ 28%
I. T.	normal	41	74	1.97	1.19
M. K.	normal	39	67	1.52	1.35
Other normal Persons 5 cases mean value		37~43 41	62~82 68		
T. B.	Liver tumour	47	70	1.78	
K. S.	gastric cancer	34	66	1.95	1.06
N. M.	hepatitis	38	64	1.08	
M. R.	acute liver Atrophy	40	61	1.30	
S. M.	acute nephritis	34	61	0.56	
A. S.	" "	32	57	0.69	
K. C.	nephrosis (reconval.)	41	56	1.41	
"	" "	41	50	1.01	
N. M.	Liver tumor	39	50	0.74	
N. T.	Jaundice	41	46	0.49	
F. W.	Liver tumor	33	45	0.42	
K. N.	Liver cirrhosis	30	45	0.36	
K. N.	Liver cirrhosis	33	41	0.53	0.31
Y. M.	Liver cirrhosis	30	39	0.30	

(2) 蛋白分割と「ポ」波との關係を究明する次の手段は當然分離した蛋白で實驗を進めることである。

A法. 低温アルコール分割法 (cohn)⁴⁵⁾による實驗.

先づ出来る限り侵襲の少い natural な状態で分離した分割についてその濃度と波高の關係曲線を得ることが必要である。そこで cohn の低温に於ける Ethanol 分割法を採用した。之は -5°C に於て PH と種類濃度を調節し乍ら「エタノール」から分離する方法である。私達の行つた實驗の概要は 0°C で血清 10 cc に 5 倍量の 23.5% (vol) のエタノールを加え、更に -5°C で 0.05 N, pH=4.1 の醋酸緩衝液 4 cc を加えて pH=5.7 とし、同温度で濾過して得た沈降物を Fraction A とする。之は主として γ globulin より成る。濾液に 91% Ethanol を加えて 40 vol.% とし更に 1/10 量の 0.8 N pH=5.9 醋酸緩衝液を加え、生ずる沈降物をとる。之を Fraction B とす之は α, β globulin を含む。更に濾液に 0.08 N pH=4.1

の緩衝液を 1/18 量加えて pH=5.1 とすると Fraction が沈澱する。之が Albumin である。之等の操作は凡て -5°C で行ふ。

Fraction A 及び C を一定量の食鹽水に溶し窒素量を測り同時 Wave Height G.S.: 1/200

に“生”及び一定のアルカリ變性をした兩者について蛋白波をとり濃度波高曲線を求めた。變性條件はいづれも 3/23 N KOH にし 20°C 以下で 30 分間作用せしめた。

結果は Fig. 1 の様に Globulin は Albumin に比し低く、變性すると兩者の差が更に著明になる。B 法。鹽析法に依る分型。

鹽析法で分ければ操作が簡單であると云う以外に、蛋白に對する鹽類の影響をも検することが出来る。そこで硫酸ソーダによる分型で同様の實驗をして Alcohol 法と比較した。

此の方法の概要は次の様である。

即ち健康血清に 19 倍量の 18.5% Na₂SO₄ を加え數時間孵卵器中においた後濾過する。沈澱は Euglobulin, 或いは $\gamma + \beta$ globulin に相當する。

濾液に更に Na₂SO₄ 結晶をいれて 28% にする。生ぜる沈澱は大體 α Globulin に相當する。濾液は Albumin 液である。

各 Fraction について鹽類共存のまま蛋白波をとり窒素を定量し濃度波高曲線をとつた。

Fig. 2 の様に A の場合と同型である。たゞ濃度が少しずれているが Pipetting の誤差かも知れない。其の外一例の肝臓癌の血清から同様の方法で Albumin Globulin をとつて蛋白波を調べたが、

Fig. 1. Wave-Height and Concentration of Serum Fractions obtained by Cohn's method

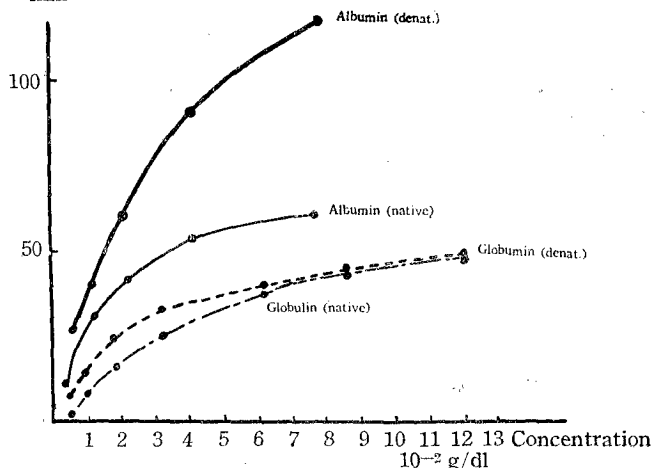
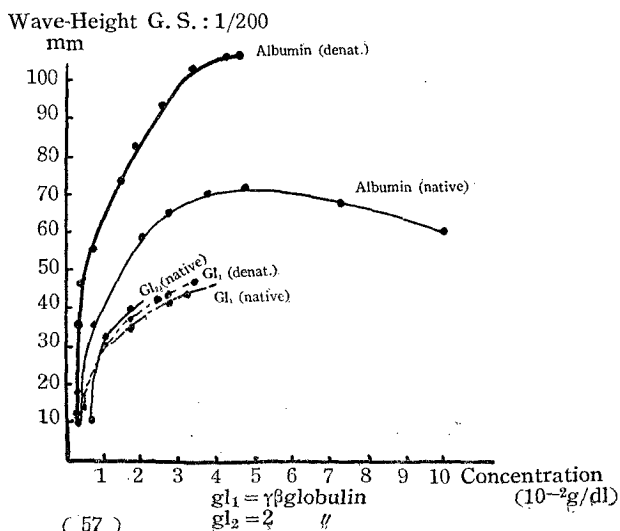


Fig. 2. Wave-Height and Concentration of Serum Fractions obtained by Na₂SO₄ Salting out.



健康人より得たものと全く同様であつた。

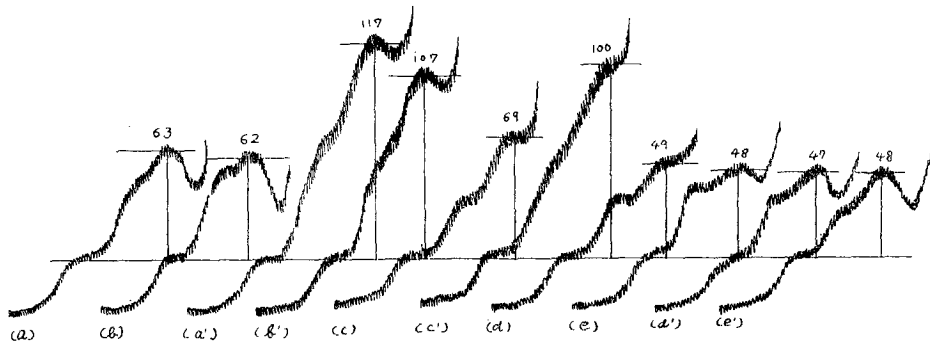
参考のため McMeekin 法によつてつくられた馬血清 Albumin についても試験したが同様の曲線を得た。以上 A.B 分離試験の示す所は次の如く要約できる。

波高について：A 法による分割も B 法による分割も大体一致して Albumin は Globulin に比し高く、變性すると後者の變化が少いから Albumin と Globulin の波高差は一層著明になる。之等のことは Globulin が血清中に相對的に多い時、比較的低い波を示すと云う臨床事實を説明するに足る根據を興える。そして之は兩者の Cystin 含有量の差に對應するし一方 Cystin を含まぬ血球 Globin は痕跡的蛋白波しか表わさぬと云う事實と考へ併せると蛋白波の Cystin 説 (Brdicka) の有力な資料となると思われる。

A 法と B 法の一致は又、鹽類の共存は蛋白波に無影響であり且つ變性効果がないことを暗示している。

波形について (Fig. 3)：この事は亦蛋白波波形からもうなづかれる。即ち A 法による分割も B 法によるものも同様な特徴をもつた波形を示した。Albumin を「生」でとると第二極小が低く變性すれば之があがる。Globulin は之に反し「生」と「變性」波で Albumin 波と丁度逆の形を示す。

Fig. 3. Polarogramms of Albumin and Globulin



1. Human albumin isolated by Cohn's method: (a) native, (a') denaturated.
2. Human albumin isolated by salting out with Na_2SO_4 : (b) native (b') denaturated.
3. Horse albumin isolated by McMeekin's method: (c) native, (c') denaturated.
4. Human globulin isolated by Cohn's method: (d) native, (d') denaturated.
5. Human globulin isolated by salting out with Na_2SO_4 : (e) native (e') denaturated.

ついで乍ら馬血清 Albumin は波高より見れば人 Albumin に大凡そ一致するに拘らず波形は人 Globulin 形の特徴を呈する。血清蛋白波は以上の波高波形の特徴から見ても Albumin Globulin の中間にある。實際取出した Albumin Globulin を再び混合した時波高、波形は A/G 比によつて決定され分離前の血清蛋白波の特徴に戻る。

従つて、血清蛋白波は Albumin Globulin の合成波であることに疑問はない所であるが只單なる總和ではなく、兩者の電極面上における干涉の結果である。例えば血清に pepton 或は gelatin を加えた場合血清蛋白波は添加前より低下する。

この様な妨害性干涉物質として血清中には pepton その他 S のない Albumin が考えられるが、決定はまだ將來にまたねばならない。

結 語

蛋白量の動搖による誤差を考慮外におくため一新變法で臨床觀察を行い、A/G 比との關係を比較し、又分離した蛋白分割で蛋白波を検討した結果「ボ」蛋白反應（プラーク第一反應）は本質的には Albumin, Globulin に關する Test であることを明確にした。臨床觀察で A/G 比と一致しない場合は表面活性の S 含量の少い干涉物質の存在と見なされる。

文 献

- 1) 笹川, 江川: 化研報告 21, 26 (1950)
- 2) " " 22, 62 (1950)
- 3) " " 24, 48 (1951)
- 4) Cohn, E. J. *et al.*: J. Am. Chem. Soc. 68, 459 (1946)
- 5) Gordon, S. *et al.*: J. Biol. Chem. 185, 139 (1950)
- 6) Major, J: J. Biol. Chem. 169, 583 (1947)