

2. 血清蛋白の「ポーラログラフ」的研究(第1報)

I. 「アルカリ」変性について

笹井 外喜雄, 江川 昌男

Polarographic Studies of Serum Protein. (I) On the Brdicka Denaturation Test.

Tokio Sasai and Masao Egawa.

We have studied the digest reaction of polarographic cancer tests (Brdicka's), regarding its fundamental conditions of serum denaturation. Measuring the heights of protein double-wave obtained in cobaltous ammonium buffer solution, we called them H_1 and H_2 respectively. Since the H_1 and H_2 changed always correlatively and the change of H_2 was greater than that of H_1 , we adopted the change of H_2 as an indicator, and called the higher one "activated" and the lower one "inactivated". Although the change of the height was almost negligible when serum was left at room temperature for a week, the height in 60°C water-bath increased about 50% in 2 minutes and then decreased. In case of the alkaline denaturation (1/5N. KOH) at room temperature, the height was at its maximum in 5 minutes, about 2 times as the native, and then gradually decreased. After 3 hours, the height became lower than that of the control. In 60°C water-bath this alkaline effect was so rapid that the height in 10 minutes corresponded to the in 24 hrs. Besides the temperature, the slope of this denaturation-time curve was found to be influenced regularly by KOH concentration; the higher the concentration, the steeper the slope.

The quantity of serum protein acted merely as a deciding factor of magnitude of this curve; but a protein-corrected test on a case of hypoproteinemia showed still lower wave height. Therefore, Brdicka reaction is considered to be that of qualitative change after all. Furthermore, we found some interesting facts that the curve flattened and the peak (maximum activation) lagged in the pathologic sera, such as cancer or portal cirrhosis. From the above results, it may be said that the denaturation, especially alkaline one, might be a combination of two phases, i. e. phase of activation and that of inactivation, which will be characterized by temperature, agent and the nature of serum itself.

緒 言

1933年 Brdicka¹⁾により発見された,「ポーラログラフ」蛋白波はコバルトのアンモニア緩衝液中で出る一種の接触還元波であり蛋白のSH基に起因するとされている。一定の変性

を行つた後の蛋白波は癌血清では健康者のものより低いという経験的事実に基いて彼は癌の早期診断法として報告した。其の後多くの追試があるが残念乍ら今日では癌特異性という点は一應否定されたがなを臨床的に興味ある反應であることに疑いない。更に K. Mayer³⁾等は血清の除蛋白濾液中の同様の波を検査し癌等では逆に反つて高い波の出現をみた。即ち之は「プロテオース」が多いことを示すもので濾液反應として之亦多くの追試がある。又最近⁴⁾は兩反應を同時に検査しその比をとると一層信頼しうる成績をうるといはれている。私達は以前から臨床材料について兩反應を追求し目下続行中であるが、一方蛋白変性の基礎的條件について「ポ」研究が不備であり現在迄 Tropp⁵⁾, Müller⁶⁾等の報告があるに止り系統的研究がなくその必要を痛感している。

そこで、今回私達は健康人血清を用い種々な変性作用によつておこる「ポ」蛋白波の変化を追跡した。先づ変性方法として最もよく使用されている「アルカリ」変性の場合の成績を報告する。

実験方法

(1) 試験液の組成は Müller に従い CoCl_2 $1.6 \times 10^{-3} \text{mol}$, NH_4Cl 10^{-1}mol , NH_4OH 10^{-1}mol の混合液で原液から実験の度毎に新たに調製する。詳細は Müller の報告を参照されたい。

(2) 使用した血清は同一人健康血清 $8.0 \sim 8.2 \text{g/dl}$ のものでその 0.1c.c. を試験液 20c.c. に混和し、ただちに感度 $1/200$ で $0.8 \sim 2.0 \text{ volt}$ の間で「ポ」蛋白波をとり2つの極大波についてそのコバルト波よりの波高を mm で計測しそれぞれ H_1H_2 とした。(1図5.)

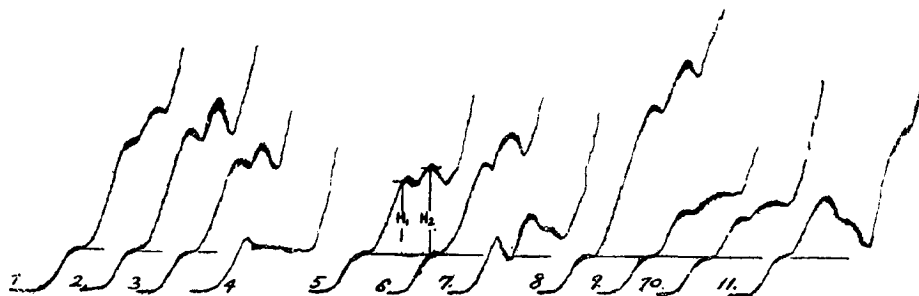


Fig. 1. Polarographic Protein waves

- | | | |
|-------------------------|--|---|
| 1. Native Serum (0.1%). | 5. Native serum (Control). | 9. 5. denaturated in N/5 KOH, 24hrs ; 20°C. |
| 2. " (0.01%). | 6. 5. denaturated in 60°C ; 2 minutes. | 10. " in N/5KOH ; 10' ; 60°C. |
| 3. " (0.005%). | 7. " in 90°C ; 15'. | 11. " in Formalin. |
| 4. Test Solution. | 8. " in N/5 KOH ; 5' ; 20°C. | |

H_1H_2 が生血清の價からどれだけ変位したかの度合を以て変性度とした。波が λ になることは見かけ上濃度の高まつた現象であるから之を活性化 (Activation) とし反対に低くなるのを不活性化 (Inactivation) と簡単に規定した。

勿論今の場合変性現象を「ボ」の変性だけに限定したわけであり、それは波の発現機構が本質的に解明されるまでは今のところ活性度を條件的に表現するものと漠然と想定しておく。

扱て実験全般を通じて H_1 及び H_2 の変動は相関性を有し特に H_2 の変化度は H_1 より大きい。この事は紫外線による変性の時も同様な結果を得ている。それ故主として変化の大きい H_2 を目標に撰びその比をも併せて問題とした。蛋白波の波形も作用に比例して崩れてくるがこゝでは参考に止めた。(1図)

(A) 対照実験及び熱変性

1. 実験の都度、未処置血清について対照をとり之と比較したが先づ生血清の陳旧効果から観察すると生血清はそのまま室温内に放置する時は一週間内の波高の変動は極めて軽微であり誤差範囲内にある、即ち「ボ」変性を認めず従つてこの間の一連の実験に對し対照となりうる。(2図、K.) 但し稀釈した血清を放置する時は数日内にある程度の変性はおこる。

2. 90~100°C の沸騰浴中に入れる時速かに波は下降し30分では、そのゲル化 (gelifica-

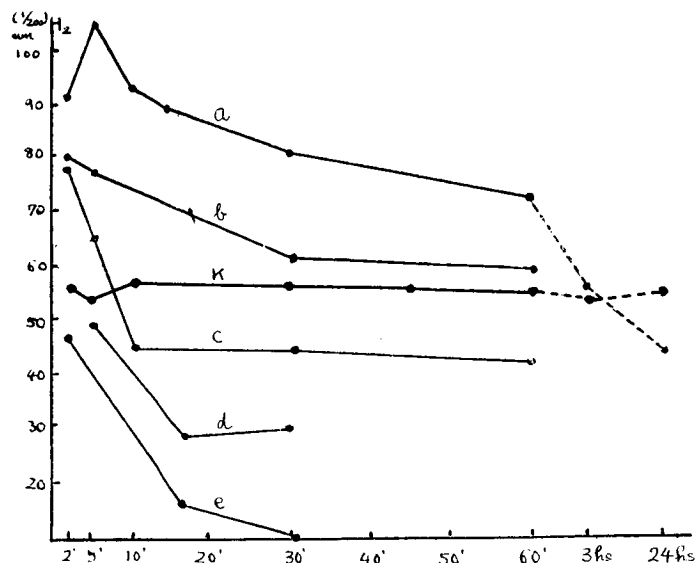


Fig. 2. Denaturation-Time Curves.

K : Control. (in native state ; 20°C) c : Denaturated in n/5KOH ; 60°C.

a : Denaturated in n/5KOH ; 20°C. d : " in 90°C (aded with Urea).

b : " in 60°C water bath. e : " in 90°C (none).

(Serum Concentration : 0.2 vol. %.)

tion) に一致して完全に波は消失する (2 図 e)

この時血清に尿素 (30%) を加えた場合はゲル化を防ぎ波の下降に対しても保護する (同 d),

3. 之に反し 60°C 水浴中に保つ時は 2 分にして最大に活性化され (波高約 1.5 倍) ついで次第に低下し 30 分位で比較的安定になる (同 b) 但しその度はさほど著明でなく波の変形も見られなかつた. (1 図 6.) この様に 60°C と 90°C の作用が正反対であること並びに下降の経過よりして加熱変性には 2 つの異つた. 過程が抱括されているもので単一な変化

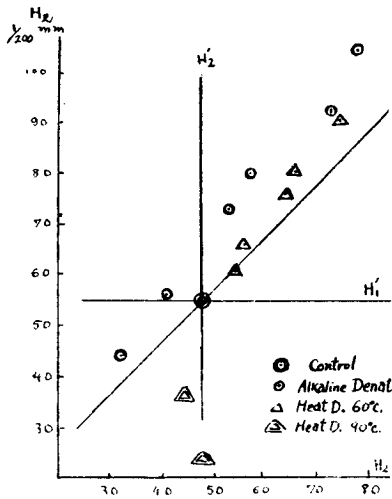


Fig. 3. Relation between H_1 and H_2 in Denaturation.

とみなされない. そして 60~80°C の間に飛躍的な変化をおこす所がある様である.

H_1H_2 の関係は 3 図△印で示した様にその相関性の存在而して H_2 の変化度のよい大きいことを示している.

この成績は Tropp に一致し Müller^{4,7)} のそれに反しているが后者の実験は蛋白以外に試験液全体の温度変化を観察したところに相異がある.

(B) アルカリ (苛性カリ) 変性

(1) 室温で N/5KNH の作用の経過は 5 分の附近に活性の極大 (波高約 2 倍) がありこの点を界として上昇の相と下降の相とが明瞭に区別される曲線を呈する. (2 図 a) 下降の相は 3 時間ではほぼ対照に等しくなり以後更に下降する.

変性過程が 2 つの段階を有することは熱変性の場合と同様であるが「アルカリ」変性に於てはより著明であり変性度も波形の変化も強い. (1 図 8, 9, 10)

H_1H_2 の関係はこゝでも熱変性の場合と同様の傾向を有している. (3 図)

なほ興味ある現象として附記することは同一条件同濃度の卵アルブミンの「アルカリ」変性に於ては血清と相異し不活性相だけしか認められなかつたことである.

(2) KOH 変性を 60°C 水浴中で行う時 (2 図 c) 10 分間で不活性相の出るのを認めた. 即ち曲線 a における場合と反対に低下しその変化度及び波形 (1 図 10) の類似から考え, 温度によつて反応が促進されて比較的安定な不活性波が急速に現れたと推測される.

(3) 「アルカリ」度の影響 0.06~0.5N. の間に於てその影響をみた結果「アルカリ」度の大きな程この曲線は早く上昇し早く下る, 即ち極大の移動がおこる事実をみとめた.

以上熱アルカリ度の 2 要素は変性~時間曲線に於てその傾斜 (速度) に関係することがわかる. それ故 KOH 変性反応 (Brđicka 反応) は之等の条件を一定にし一定時間に検査す

る必要がある。之等の実験は亦蛋白量が一定であるが而し臨床材料に於て血清蛋白量を一定に保つことは必ずしも容易でない、癌等で変性波の低いのは單に低蛋白症の合併のためだという論難の生ずる所以もこゝにある。⁸⁾そこで次ぎに健康血清と病的血清とについて実験した。

(4) 「アルカリ」変性に対する蛋白量の影響

一定濃度の「アルカリ」の下で血清蛋白量0.2~0.09 Vol % の間の変動は4図の様に変性波は對應する生血清の波高に對し著明に高く且つ30分と60分の値が全く平行している。この事は蛋白量という要因は変性速度でなく反應の大きさにのみ關係するものだといえ

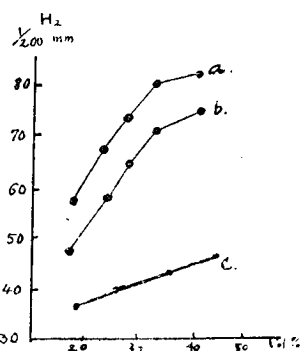


Fig. 4. Serum Concentration and Wave Height.

- a. Alkali Denaturation 30'
- b. " 60'
- c. Native State.

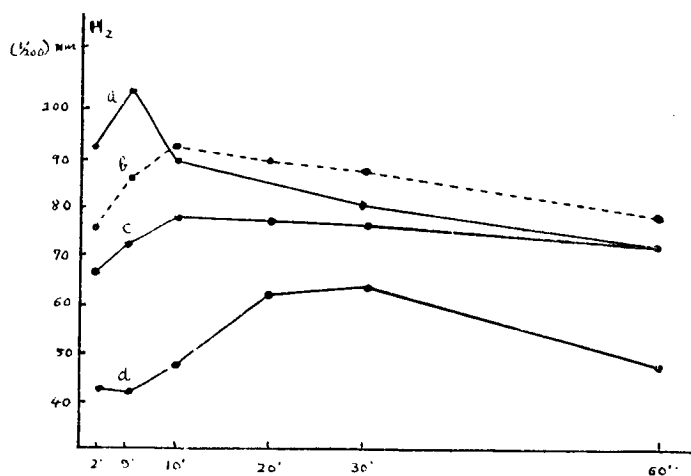


Fig. 5. Alkaline Denaturation-Time Curve. (Pathologic Case)

- a : Healthy Serum (Protein Conc. 8.02 g/dl).
- b : Corrected Test of Case c for protein Conc. from 6.3 g/dl to 9.0 g/dl).
- c : A case of Gastric Ulcer (Protein Conc. 6.3 g/dl).
- d : A case of Portal Cirrhosis (Protein Conc. 6.7 g/dl).

る。實際病的例に於て用うる血清量を加減してみてもこの事が実証されるのである。(5図 b. c.)

それ故一定時間における変性波の高低のみを問題とする時 (Brdicka 反應) に於ては当然血清蛋白の含有量に対し充分考慮を拂う必要がある. 又一方蛋白量の少いもの必ずしも常に変性波は低いと限らぬ例えば 5 図でその量の多い d 例が c 例よりも低い.

更に波高以外に就いて見ると, 病的例に於ては曲線の傾斜從つて又 peak [ピーク] (変性の最大波の点) 位置が遅れている. この様な「ずれ」は今迄の成績では温度「アルカリ」度によつて規定される筈だつた. 聞るにこの條件の一定の下でもなお, かゝる変位のあるのは血清蛋白自身の質的變化に歸さねばならない. 亦変性過程が活性化と不活性化の 2 つの相から成るという上述の觀察からしてこの質的變化というのは当然両相の状態變化として把握される. 卵「アルブミン」の場合は活性相を欠いた極端な場合として甚だ暗示に富む, 血清蛋白の Albumin Globulin 組成との關係は今後の課題である.

要するに, Brdicka 変性反應 (Digest reaction) は蛋白量による動搖があるにも拘らず一つの質的反應であり不安定な変性過程を觀察するものであるといえる. 今后は 2 相をふくんだ過程という点を重視して動的な觀察が必要であらう.

文 献

- 1) Brdicka, R; Collect. Czechoslov. Communicat. 5, 112 (1933)
- 2) ; Klin. Wochenschr. 18, 305 (1939).
- 3) Waldschmidt Leitz und Mayer, K. ; Z. physiol. Chemie 261, 1 (1939).
- 4) Müller, O. H. and Davis, J. S. ; J. Biological Chemistry 159, 667 (1945)
- 5) Tropp, C et al. ; Z. physiol. Chemie 262, 210 (1939)
- 6) Müller, O. H., and Davis, J. S. ; Arch. of Biochemistry 15, 39 (1947)
- 7) Müller, O. H. ; Am. J. Physiol. 133, 393 (1941)
- 8) Greenstein, J. P. ; Biochemistry of Cancer, Chap II (1947) (Book)

(1949年11月30日受理)