赤血球溶血液の電気泳動的研究 (豫報)

京都大學醫學部内科學第三講座 (擔當前川孫二郎教授)

醫學博士 前川 孫二郎・醫學博士 熊谷 直家

醫學博士 荒木 仁・醫學士 中澤 輝郎

Electrophoretic Studies on Red Blood Cell Hemolysates.

(A Preliminary Report)

M. Maekawa, N. Kumagai, S. Araki, and T. Nakazawa.

(The Third Medical Clinics of Medical Faculty of Kyoto University,

Director, Prof. M. Maekawa

Electrophoretic experiments of red blood cell hemolysates obtained by hemolysing with distilled water were carried out, in order to prove the allergic antibody, which has been expected to adhere in the erythrocyte. Results obtained are as follows.

- 1). The electrophoretic patterns were obtained on 9 rabbit, 28 human, and 2 goat red blood cell hemolysates from which stroma were removed. In these diagrams there were recorded a, c, Hb and b components mobilities of which were about -4.3 , -1.9 , and -1.1×10^{-5} cm. 2 per volt per second at pH 8.0, respectively.
- 2). b protein in rabbit and c protein in human red blood cell hemolysates were hardly demonstrable, but c protein in goat was remarkable.
- 3). In rabbit red blood cell hemolysates, which were sensitized with the mixture of phosphatides of rabbit erythrocytes and cx sera or with cx sera only, the peak which was thought to be allergic antibody (X protein) was recorded as a component having mobility faster than Hb protein. The mobility of this protein is about -2.9×10^{-5} cm. 2 per volt per second. This peak disappeared at the 2nd day after reinjection of the antigen mentioned above.
- 4). Some of human erythrocytes, in septicemia, subacute bacterial endocarditis and rheumatic diseases had X peak. In the bone marrows of these patients the erythropoiesis was almost attacked. Not all the anemic diseases had X peak in their erythrocytes.
- 5). c protein seems to be rich in lipid on account of its decrease of the area of electrophoretic pattern after extraction. It is interesting to find that in two cases of nephritic human erythrocytes, c component was remarkable.
- 6). It is doubtful whether the peak appearing before or behind Hb peak is due to the denaturing product either in vivo or in vitro, but it is more enhanced in rheumatic diseases.

In summer Hb peak were divided clearly into two peaks by denaturation when red blood cell hemolysates were kept at room temperature.

1. 緒 言

血清又は血漿の電気泳動的研究は、Tiselius の装置¹⁾が出現して以來、隆盛をきわめ長足の進歩をなした。それと並行してその他の蛋白溶液の電気泳動も盛んに行われてゐるが、血清血漿程簡單でなく、その意味づけに至つては全く不明という現状である。それ故ある蛋白について原著の發表があると、それを金料玉條となし追試批判もしないで引用するだけにとどめている。これは蛋白體が餘りにも複雑であるというよりは、思索の貧困を示しているのである。

組織蛋白として最も簡単な赤血球の電気泳動について

の文献も甚だ少い。Abramson, Dozois & Hachtel²⁾等は單に赤血球の易動度を測定しているし、Furchgott & Ponder³⁾は赤血球就中外膜成分の易動度を測定しているに過ぎない。1945年 Stern⁴⁾等は赤血球溶血液の電気泳動圖を示して注意をひいたが、僅かに人2例、犬1例、鶏1例についてであり、それ以後は更に之を追求していない (Stern と中澤との個人的文通による)。

著者等は數年來各種組織細胞磷脂質を以てする組織アレルギー⁵⁾の實驗をしている。就中赤血球磷脂質によるアレルギー性貧血 (Erythron-Allergy と呼ぶ) は、アレルギー現象を定量的に觀察する事が出来るので種々抗原分析をする一方、抗體分析も行い、Erythron-Allergy の

抗體は赤血球に附着しているであろうという結果を得た。著者等は更に之を實證するため、赤血球溶血液の電気泳動法による研究を始めた。これは一般に著者等の行っている一連の組織アレルギーの抗體を究明する先驅をなすものである。

2. 實驗材料並びに實驗方法

實驗に使用した赤血球は家兎9例(健康家兎2例, 赤血球磷脂質加牛血清感作家兎6例, 牛血清感作家兎1例), 人28例(健康人1例, 亜急性細菌性心内膜炎2例, リウマチ性心瓣疾患6例, 關節リウマチ2例, アレルギー性素因2例, 敗血症3例, 腎炎2例, 結核5例, パンチ氏病2例, 貧血症3例), 山羊2例である。

家兎の感作方法として赤血球磷脂質は, 磷脂質には種屬特異性がない點より牛赤血球より抽出し, 家兎1匹に對し1回10mgを使用し, 牛血清は當kg2cc用い, 3日目毎に6乃至8回感作した。感作終了後20日目の採血赤血球を檢査した。

採血は主として3.8%くえん酸を附加して行い, 直ちに遠心して沈渣赤血球を生理的食鹽水にて洗滌し再び遠心する。この操作を3回繰返し, 最後の遠心は毎分2500回轉10分間行い, 沈渣赤血球1.5ccを豫め7.5ccの蒸留水を入れた試験管にとり振盪し完全に溶血させ, 更に7.5ccの泳動用磷酸緩衝液を加え振盪する(この際赤血球外膜, ストロマのため濁濁する)。これを350番のセロファン紙に包み同じ緩衝液で透析する。透析後濾過すれば濁濁沈澱物は可成り除去されが, それでも濁濁が強度の場合には更に強力に(毎分3000回轉20分間)遠心すれば透明となる。この様にして得た溶血液は多少の相違はあるが, 蛋白量は全體1.0~1.5g/dlである。

緩衝液はPH 8.0イオン強度0.1の磷酸緩衝液を, 裝置は日立製作HT-A型テセリウス装置を用い, ダイアゴナルスリットは傾斜を30°~40°とし, 幅を6mmにした。電壓約200ボルト, 電流約0.014アンペア, 溫度0.8~4.0°C, 泳動時間7200~12600秒であり, 易動度の測定は下降脚によつた。

3. 實驗成績

被檢例数は39例であるが, 上昇下降共に満足する様な泳動圖を得たのは少い。又綺麗な泳動圖は得られたが, 易動度が測定出来なかつたりしたので, 大體の傾向と少数例から得た成績を記述する。

赤血球溶血液の電気泳動圖の基本型は, Sternの命名に従えば, 最も大きな峰はヘモグロビンである。最も早い速変を有し乳白色の分層がa蛋白, ヘモグロビンより

遅い峰がb蛋白, ヘモグロビンとa蛋白との丁度中間の峰がc蛋白(但しこのc蛋白は鶏の有抗赤血球に於て)である。著者等もヘモグロビン峰を指標としてSternの言う像を明確に認めるものもあるし, 又認めないものもある。更にc蛋白とヘモグロビンとの間にも一つの新しい峰を認めるものもある。著者等は之をX峰と命名した。これ等の峰が全部出現したとして, その復型圖を書くと第1圖の様である。

a. 家兎赤血球

(i) 健康家兎2例, a蛋白何れも著明, b蛋白何れも著明でない。c蛋白認められる様である。ヘモグロビンに峰の亂れ(結節と呼ぶ)がない。

(ii) 赤血球磷脂質加牛血清感作家兎6例, 全例にa蛋白あり, b蛋白出現著明1例, c蛋白出現3例, ヘモグロビン峰の前脚に結節のあるもの1例, 後脚に結節のあるもの1例, X峰出現4例である。この群で易動度を測定する事が出来た1例について, 同じ赤血球溶血液に5%のエーテルを加え, エーテル層を除去したものについて泳動し, 更に亦その家兎に赤血球磷脂質加牛血清を効果注射し2日目(この際貧血を起している)の採血赤血球について泳動したものを比較した。赤血球磷脂質加牛血清感作家兎赤血球泳動圖で明かにc蛋白とX峰を認めていたが, 同一赤血球でもエーテル可溶成分を除去したものではc蛋白消失し, 更にその家兎に効果注射した後の赤血球ではX峰が消失した(第1表)。

(iii) 牛血清感作家兎1例, a蛋白著明でない, b蛋白著明, c蛋白著明, ヘモグロビン峰に結節を認めない。X峰出現した。

b. 人赤血球

(i) 健康人1例, a蛋白著明, b蛋白著明, c蛋白著明でない。ヘモグロビン峰の後脚に結節を認める。これ等各幾分の易動度を示せば第2表の様である。

(ii) 亜急性細菌性心内膜炎2例, a蛋白著明, b蛋白著明, c蛋白認められない。ヘモグロビン峰の前脚に結節を認めるもの1例, X峰が1例に著明に出現した。

(iii) リウマチ性心瓣膜疾患6例, a蛋白何れも著明, b蛋白著明なもの2例, c蛋白認められない。ヘモグロビン峰の後脚に結節を認めるもの4例, X峰出現2例である。

(iv) 關節リウマチ2例, a蛋白不鮮明, b蛋白著明1例, c蛋白著明でない。ヘモグロビンの前脚に結節を認めるもの1例, 後脚に結節を認めるもの2例, X峰1例に出現した。

(v) アレルギー性素因2例, a蛋白著明, b蛋白著明, c蛋白認めない。ヘモグロビン峰に結節なく, X峰1例に不鮮明であるが出現した。

(vi) 敗血症 3 例、但しこれは同一人で経過を追つたものである。a 蛋白著明、b 蛋白著明なもの 2 例、不鮮明 1 例、c 蛋白認めない。X 峰は最初の 2 回目まで出現し、回復後は認めない。

(vii) 腎炎 2 例、a 蛋白著明でない。b 蛋白著明 1 例、不鮮明 1 例、c 蛋白著明 2 例、ヘモグロビン峰の後脚に結節を認めるもの 1 例、X 峰は認められなかつた。

(viii) 結核 5 例、a 蛋白著明でない。b 蛋白著明 4 例、著明でないもの 1 例、c 蛋白認められない。ヘモグロビン峰の前脚に結節を認めるもの 2 例、X 峰は 1 例に不鮮明ではあるが出現した。

(ix) パンチ氏病 2 例、但し同一人で検査年月日の異なるものである。a 蛋白著明、b 蛋白著明、ヘモグロビン峰に結節なく、c 蛋白認められない。X 峰も出現しない。

(x) 貧血 3 例、a 蛋白著明、b 蛋白著明、c 蛋白 1 例に於て著明、ヘモグロビン峰に結節を認めるもの 1 例、X 峰は 1 例に出現した。その X 峰を認めた 1 例は鐵不足貧血であり、他の貧血は再生不良性貧血と鐵不足貧血である。

C. 山羊赤血球

2 例、a 蛋白著明、b 蛋白著明なもの 1 例、不鮮明 1 例、c 蛋白何れも著明、ヘモグロビン峰に結節を認めない。殊に Middlebrook-Dubos¹⁰⁾ の舊ツベルクリン感作赤血球を作り泳動すれば、c 蛋白はより一層著明となる。

上述した家兎並びに人の赤血球で易動度を測定したものは、第 1 表、第 2 表に示した通りであるが、その平均値をとり赤血球溶血液の各成分の易動度の大體を示すと、a 蛋白 -6.7, c 蛋白 -4.3, ヘモグロビン -1.9, b 蛋白 -1.1, X 峰 $-2.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ である。

4. 考 按

著者等は種々な臓器細胞磷脂質を異種蛋白に附加したものを抗原として、家兎を感作する事により、使用した磷脂質と同名の臓器に選擇的にアレルギー炎症を惹起せしめた。このことは赤血球磷脂質を用いても立派に赤血球系にアレルギー性貧血を起し、之を前川は Erythron-Allergy と命名した。このアレルギーの本態を知ろうとして、赤血球磷脂質加牛血清を抗原として、感作した家兎赤血球を溶血させ電氣泳動した處、ヘモグロビン峰より若干易動度の早い位置に特異な峰を認めた。これは Stern が命名した a 蛋白、c 蛋白より易動度遅く、而も健康家兎赤血球では認められないので、これこそアレルギー抗體だと考え X 峰と命名した。それで赤血球磷脂質加牛血清感作家兎 6 例について行つて見ると、4 例に峰を認めた。X 峰を認めない例もあり而もその峰が餘り大きくないのは、現在行つている方法が悪いのであろう。

即ち蒸留水を加え溶血させた赤血球液に、磷酸緩衝液を加えると濁濁する。それは赤血球外膜もしくはストローマが析出するためであらう。それを濾過乃至遠心して可及的に除去したものを泳動しているために、峰が小さく、又出現しないものもあるであらう。中澤はストローマ丈を集めて、PH 9.0 のアルカリ溶液で透明溶液となし、泳動したが現在まで満足する様な結果を得ていない。

X 峰は牛血清感作家兎赤血球にも認められた。この事は Erythron-Allergy で前處置に牛血清感作すだけでも、効果注射に赤血球磷脂質加牛血清を使用すれば、貧血が起るという實驗成績を説明するに便利である。

人間に於て特に著明に X 峰を認めたのは、敗血症 1 例、亞急性細菌性心内膜炎 1 例、心臟瓣膜症 1 例に於てである。殊に敗血症の 1 例はその原因が腸間膜りんば腺炎によるもので、入院當初は赤血球數 213 萬、血色素 40%, 色素係數 0.93, 白血球數 7550, 血小板 88000, ヘマトクリット値 23.1, 血液像では好中球 74.0 %, りんば球 23.5 %, 網狀赤血球 0.4 %, 赤沈 97.0, 出血時間凝固時間正常、骨髓像では赤血球形成 6.8 %で著しく低下し、骨髓性細胞形成はやや増加していた。この様な状態の時或は若干經快した時の赤血球溶血液の電氣泳動圖では X 峰を著明に認めた。ストレプトマイシン等の化學療法劑を用いたり、腸間膜りんば腺を別出して、赤血球數も正常となり、骨髓の赤血球形式も 21.4 % になつたとき赤血球の泳動圖では、X 峰は認められなかつた。又 X 峰の著明に出現した亞急性細菌性心内膜炎の患者の血液像は、赤血球數 240 萬、血色素 52%, 白血球數 14000, 網狀赤血球 3 %, 好中球 74 %, りんば球 17 %, 赤沈 109, 骨髓像は赤血球形成 7.2 %, 骨髓性細胞形成は増加している。心臟膜症の 1 例では貧血なく、好酸球 14.0 %で、骨髓の赤血球形成も異常なく、ただ好酸球の増加を認めた。

Stern は a 蛋白が赤血球そのものの易動度と同じ故に、a 蛋白はその外膜に由來するであらうと想像した。そして鶏の赤血球に見られた c 蛋白は、核によるかも知れない様な印象を受けるが、著者等はそれに相當する峰を山羊赤血球には明確に認め、感作家兎赤血球にも屢々認め、人間では餘り認められなかつたが、腎炎の 2 例に於ては著明に認められる。而も溶血赤血球にエーテルを加え、エーテル層を除去する事により、此の c 蛋白が減ずる故、c 蛋白がより類脂體を含むものと想像される。

ヘモグロビン峰の前脚又は後脚に結節を認めるものが可成り多くあるが、これはヘモグロビンそのものの試験管内變性が又は體內病的變性が明かでない。疾患としてはリウマチ疾患によく出現し、試験管内變性の著明な例としては、夏季に室温に長時間放置し變化したヘモグロ

ピンは、明かにその中間に於て峰が二つに分離する(第2圖)。

5. 總 括

赤血球に附着していると思われるアレルギーに體を證明しようとして、赤血球を蒸留水で溶血させた溶血液を電気泳動した。且つそれに附隨して發見した事項は次の通りである。

(1) 家兎赤血球9例、人赤血球29例、山羊赤血球2例の溶血液(外膜、ストローマは大部分除かれている)を電気泳動した。原則としてa蛋白、c蛋白、ヘモグロビン、b蛋白を認める。その各々の易動度は夫々大體 $-6.7, -4.3, -1.9, -1.1 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ である(PH 8.0 イオン強度 0.1の磷酸緩衝液に於て)。

(2) 家兎赤血球ではb蛋白を認め難く、人間ではc蛋白を認め難い。山羊赤血球ではc蛋白著明である。

(3) 赤血球磷脂質加牛血清感作家兎赤血球及び牛血清感作家兎赤血球に於ては、アレルギー抗體と思われる峰(X峰と命名する)を、ヘモグロビンの直ぐ前に多く認める。X峰の易動度は大體 $-2.9 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$ である。又該峰は赤血球磷脂質加牛血清の効果注射後2日目の赤血球に於ては消失していた。

(4) 人間に於ても殊に敗血症、亞急性細菌性心内膜炎、リウマチ性疾患に於てX峰を認めるものがある。この様な例ではその骨髓は多く赤血球形成悪く、多く貧血がある。併し貧血患者すべての赤血球にX峰が出現するというわけではない。

(5) c蛋白はエーテル附加により大部分除去される故に、多分類脂體を多く含むであろう。人間では殊に腎炎の2例に於てc蛋白著明であるのは興味深い。

(6) ヘモグロビン峰の前脚又は後脚に生ずる結節は、ヘモグロビンの生體外變性が、又は生體内病變性であるか不明であるが、疾患としてはリウマチ疾患によく出現する。夏期長時間設置して變化した赤血球では、ヘモグロビン峰は著明に二つの峰に分離する。

第1圖 赤血球溶血液電気泳動模型圖

第2圖 變性人赤血球溶血液電気泳動圖

第1表 赤血球磷脂質加牛血清 (EP+S) 感作家兎赤血球溶血液成分の易動度

實驗 希號	被檢物	泳動 時間	易動度 $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$				
			a蛋白	c蛋白	X	ヘモグロビン	b蛋白
No. 984	EP+S感作家兎赤血球	7200秒	-6.88	-3.98	-2.72	-1.83	-0.82
No. 985	同液のエーテル可溶性成分除去	7200	-6.96	認めず	-3.30	-1.88	-1.06
No. 1007	効果注射直後赤血球	9000	-5.74?	-3.82	認めず	-1.71	-0.96

第2表 人赤血球溶血液成分の易動度

實驗 希號	被檢物	泳動 時間	易動度 $\times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ volt}^{-1} \text{ sec}^{-1}$				
			a蛋白	c蛋白	X	ヘモグロビン	b蛋白
No. 1176	健康人	10800秒	-6.81	-4.77*		-2.03	-1.43
No. 1111	急性肺炎症	10320	-6.07			-1.73	-0.96
No. 1132	代償性貧血	10860	-4.78?		-2.57	-1.88	-1.25?
No. 1181	心筋梗塞	10560	-7.51			-2.42	-1.71
No. 1175	急性心臓病	10800	-6.90			-1.88	-1.09
No. 1182	同	10800	-7.17	-5.03	-3.15	-1.75	-1.05

* このc蛋白は著明でない
No. 1182 は上片脚を測定した

文 献

- 1) Tiselius, A.: Trans. Farad. Sec., 33, 524 (1937); Kolloid Z., 85, 129 (1938)
- 2) Abramson, H.A.: J. Gen. physiol., 12, 711 (1923)
- 3) Dozois, K.P. & Hachtel, F.W.: J. Lab. & Clin. Med., 22, 1252 (1937)
- 4) Furchgott, R. F. & Ponder, E.: J. Gen. Physiol., 24, 447 (1940)
- 5) Stern, K.G., Reiner, M. & Silber, R. H.: J. Biol. Chem., 161, 731 (1951)
- 6) 前川孫二郎: 臨床内科小児科 2, 1 (昭29); 血液討論會報告第1輯, p. 203 最新醫學社, 大阪(1948); 診断と治療, 36, 91 (昭23); 日本内科学會雜誌, 38, 177 (昭24); 同誌, 39, 133 (昭25); 同誌, 40, 242 (昭26); 日本臨床, 8 (1), 5 (昭25); 同誌, 9 (4), 69 (昭26)
- 7) 鷺津正, 他: 日本循環器學誌, 11, 77 (昭23); 12, 79 (昭23)
- 8) 前川孫二郎, 他: 日本内科学會雜誌, 40, 242 (昭26); 日本臨床, 9 (4), 69 (昭26)
- 9) 荒木仁, 森澤曜: 日本循環器學誌, 14, 206 (昭25); 14, 240 (昭26)
- 10) Middlebrook, G. & Dubos, K. J.: J. Exp. Med., 88, 521 (1948)
- 11) 中澤輝郎: 未發表