〔原 著〕

ポリアクリルアミド・ゲルを支持体とする電気泳動法*

IV. ディスク電気泳動法による中耳腔貯溜液(耳管カタル) 蛋白の分析

茂 木 五 郎**

Summary

Proteins contained in the effusions of serous otitis media were analyzed by Disc electrophoresis. The electrophoretic patterns were compared with those of serum from the same patients.

The number of protein fractions was less than that of serum from the same patient. The most distinct characteristics of the electrophoretic patterns of the effusions was that S_{β} fraction disappeared, haptoglobins became indistinct and gamma globulin increased in all cases.

I 緒 言

中耳腔貯溜液の発生原因についていまだに定説のないことは周知の通りであるが、貯溜液の由来に関しては¹⁾、血液成分が移行するという考え²⁻⁷⁾と、慢性炎症によって metaplasia の結果生じた腺性要素からの積極的分泌によるという考え⁸⁻¹⁰⁾がある。

Schlanger¹¹⁾ は中耳腔貯溜液の蛋白濃度が 3.9 % 以上の場合を exudate とし、それ以下の場合を transudate であるとした。Ivstam¹²⁾ は貯溜液中の hexosamine と fucose の量が同一人の血清の値より小さい場合を serous type とし、血清と等しい場合を mucous type とした。Robinson¹³⁾ は蛋白濃度が大きく多数の多核白血球を含んでいるものが exudate であり、蛋白濃度の低い場合が transudate であると報告している。また Hoople¹⁴⁾ は中耳腔貯溜液に serous なものと mucous なものがあり、serous なものは中耳腔が陰圧となって生じる transudate でその蛋白濃度は大きく、mucous なものは炎症の結果生じる exudate でその蛋白濃度は小さいと述べている。

このように中耳腔貯溜液の理化学的性状は報告者によってまちまちで、必ずしも一定していないといえる。

電気泳動法は蛋白質の優れた分析方法の一つであるが、ことに高分解能電気泳動法¹⁵⁾と呼ばれている免疫

泳動法¹⁶⁾、デン粉ゲル泳動法¹⁷⁾ およびアクリルアミド・ゲル泳動法¹⁸⁻²¹⁾ は従来の方法にみられなかった高度の分解能力を示す。著者ら²²⁻²⁶⁾ は既報のようにアクリルアミド・ゲルを支持体とするディスク泳動法によって血清、髄液ならびに諸体液蛋白の分析を試みた。本編では本論文第 1 編²⁷⁾ で報告した方法に従い、耳管カタル時に生じた中耳腔貯溜液を同一人の血清と並列して泳動し、比較検討した。

II 実験方法

1) 材料 a) 中耳腔貯溜液：国立下関病院耳鼻咽喉科外来患者 5 例より採取した。すなわち耳管カタルと診断され、鼓膜穿刺によって採取した中耳腔貯溜液である。b) 血清：同一患者より採血し、2 時間以内に分離した血清を使用した。

実験に用いた中耳腔貯溜液および血清は採取に際し溶血の認められなかったものであり、採取後直ちに使用するか、または凍結保存し 2 週間以内に使用した。

2) 試薬：本論文第 1 編²⁷⁾ で報告した方法に従った。すなわち細孔ゲル濃度 7.5%, pH 8.9. 粗孔ゲル濃度 2.5%, pH 6.7. 槽用緩衝液 トリス-グリシン緩衝液, pH 8.3.

3) 装置および操作法：本論文第 1 編に報告した方法

* Electrophoresis using polyacrylamide gel as a supporting medium. 4. Analysis of protein fractions of serous otitis media effusions by means of disc electrophoresis.

** Goro Mogi, 山口大学医学部耳鼻咽喉科学教室 (主任 本庶正一教授) 指導：山口大学医学部生化学教室 (中村正二郎教授)

に従った。すなわち内径 5 mm, 長さ 65 mm のガラス管にまず細孔ゲル (アクリルアミド・7.5%, BIS* 0.2 %, TEMED** 0.0575 mg/dl, pH 8.9, トリス緩衝液) の層約 50 mm 作り, この上へ粗孔ゲル (アクリルアミド 2.5 %, BIS 0.625 %, TEMED 0.3 mg/dl, riboflavin 0.5 mg %, pH 6.7, トリス緩衝液) の層約 10 mm を作り, 最後に粗孔ゲルに 1/50 の試料 (0.003 ml (但し総蛋白量の低い場合にはその 2 倍量を使用した)) を加えた試料ゲルの層を作る。試料ゲルの量は 0.015 ml を標準とした。ゲルをつめたガラス管は上部緩衝液槽の底に試料層を上にしてとりつけ, 下端を下部緩衝液槽に浸して通電する。

4) 泳動条件: 電流は一つのガラス管あたり 1.5~3 mA, 電圧は 130~150 V, 泳動時間は 1 時間 30 分~2 時間 30 分とした。

5) 蛋白の固定, 染色および脱色: 泳動を終ったゲルは管からとり出し, 7 % 酢酸溶液 100 ml 中に Amidoschwarz 10 B を 1.0 g の割合で溶かした液に約 1 時間浸して染色し, のち 7 % 酢酸溶液で洗滌脱色した。

6) 総蛋白濃度: 日立屈折蛋白計を用いて測定した。

7) 蛋白分画の濃度測定: ディスク泳動法により分離された蛋白分画は, 沔紙泳動用自記濃度計を改造して濃度曲線をえがき, これから各分画の図形を切断し, 重量法により相対濃度を算出した。(赤色フィルター使用)

III 実験結果

中耳腔貯溜液の蛋白分画は便宜上同時に泳動した血清と易動度のほぼ等しい分画を同じ名称で呼ぶこととした。

中耳腔貯溜液の総蛋白濃度 (表 1) は血清の値よりも

表 1 ディスク泳動法による中耳腔貯溜液 (耳管カタル) 蛋白および同一人血清蛋白分画の濃度百分率 (%)

cace	age	sex	Effusion (Serum)	T P.	ρ	A	α_L	$\alpha_1' \alpha_2'$	F α_2	Tr	β_2'	$\beta\gamma$	S α_2	S β
1	72	合	E (S)	6.3 (7.8)	0.5 (0.6)	55.4 (55.0)	1.4 (1.5)	1.2 (1.7)	0.6 (0.5)	6.4 (5.7)	0 (0)	29.9 (25.6)	4.6 (7.1)	0 (2.3)
2	63	〃	E (S)	3.0 (7.0)	0.4 (0.3)	65.1 (60.1)	2.0 (3.3)	1.3 (1.7)	0.6 (1.5)	7.6 (9.9)	0 (1.2)	21.6 (17.8)	1.3 (3.2)	0 (1.0)
3	61	〃	E (S)	9.8 (7.4)	0.3 (0.4)	59.3 (63.4)	1.8 (2.2)	0.8 (1.2)	0.5 (0.9)	7.2 (6.1)	0.6 (1.4)	27.0 (18.0)	2.5 (3.6)	0 (2.8)
4	72	〃	E (S)	13.0 (9.2)	0.1 (0.1)	52.7 (57.5)	1.4 (2.0)	0.4 (2.2)	0.6 (1.0)	5.6 (6.1)	0 (0.7)	36.3 (24.4)	2.9 (4.5)	0 (1.5)
5	67	〃	E (S)	9.8 (8.0)	0.1 (0.2)	63.8 (60.1)	3.1 (2.5)	1.0 (1.4)	0.5 (1.1)	11.1 (7.6)	0.6 (1.3)	17.3 (17.0)	2.5 (6.8)	0 (2.0)
			E (S)	8.4 (8.0)	0.3 (0.3)	59.3 (59.2)	1.9 (2.3)	0.9 (1.7)	0.6 (1.0)	7.6 (7.1)	0.2 (0.9)	26.4 (22.4)	2.8 (6.2)	0 (1.1)

T. P.: Total Protein g/dl () 内は血清値

著しく低いものもあり高いものもあって, 一定していなかった。

中耳腔貯溜液蛋白の泳動像 (図 1) は, 同一人血清の泳動像 (図 2) とくらべ, 全例とも出現分画数が減少していた。しかし特別の蛋白分画は認められなかった。分画数の減少は γ -glob 領域に著しく主に haptoglobin に相当する分画が不明瞭となるか消失しているように見えた。また全例とも血清の S β に相当する分画が認められず, S α_2 に相当する分画も血清のものほど明瞭でなかった。 γ -glob は血清よりも濃厚に認められた。各分画の濃度百分率は表に示した通りであり, alb は全例とも

同一人血清の値とほぼ一致していた。Transferrin は第 5 例では貯溜液で著しく大きい値を示したが, 他はほぼ血清の値に近く, 平均値ではやや高い値を示した。 $\beta\gamma$ 値は貯溜液で大きく, ことに第 4 例では著増していた。S α_2 は全例とも血清にくらべ著しく低下していた。少量成分では prealbumin はほぼ血清の値に等しかったが, α_L , $\alpha_1' \alpha_2'$, F α_2 および β_2' はいずれも血清より低下していた。

考 按

中耳腔貯溜液蛋白の電気泳動的研究は Ivstam²⁸⁾ Carlson ら²⁹⁾, 上山³⁰⁾ らの沔紙泳動法による報告があり, また最近では Hopp ら³¹⁾ の免疫泳動法による報告がみられる。Ivstam²⁸⁾ および上山³⁰⁾ は貯溜液中の蛋白

* N,N'-Methylenebisacrylamide

** N, N, N', N'-Tetramethylethylenediamine

図1 中耳腔貯溜液の泳動像
使用量 0.003ml, 泳動条件 2mA,
130V, 1時間50分

図2 同一人血清の泳動像
使用量 0.003ml, 泳動条件 2mA,
130V, 1時間50分

はすべて血清に存在しているものであり、泳動像は血清のそれと酷似していたと報告している。Carlson ら²⁹⁾によれば中耳腔貯溜液の総蛋白量は同一人血清の値より高いことを認め、これは貯溜液水分の再吸収によるばかりでなく、貯溜液の生じる際に別の積極的要素が関与するのであろうと述べている。また各分画の増減については慢性例では alb 値が低く、急性例では alb 値が高いと報告している。これは alb のような分子量の小さい蛋白

は、他の血清蛋白よりも毛細管からの漏出が容易であり、慢性例では alb が容易に再吸収されるために濃度が低下するものであろうと説明している。また α_2 -glob は急性例で著しく低下しており、これは同蛋白の分子量が大きく、漏出が容易でないためであるとしている。慢性例で貯溜液中の γ -glob が増加しているが、これは同蛋白が中耳で合成されるのであろうと推論している。このほか貯溜液中には fibrinogen が認められず、また全例の $\frac{1}{3}$ に alb に先行する小成分の出現をみたと報告している。Hopp ら³¹⁾ は中耳腔貯溜液蛋白を寒天ゲル免疫泳動法によって分析し、貯溜液中の蛋白はすべて血清蛋白と同一のものであり、その由来は血液の漏出によると結論している。しかし貯溜液蛋白の泳動像についての記載はない。著者の成績では haptoglobin, S_{α_2} -macroglobulin および S_{β} -lipoprotein のような高分子の蛋白分画が不明瞭となるか消失している。これは Carlson ら²⁹⁾ のいうようにこれら蛋白が高分子量であり、毛細管からの移行が容易でないためであると考えられることもできる。病的状態で体蛋白が生体外へ排出される場合、罹患臓器ないしは組織により多少の差はみられるが、高分子蛋白の排出され難いことは諸家の一致して報告³²⁻³⁴⁾ するところである。我々^{23-25, 35)} がディスク泳動法によって分析した髄液の泳動像を図3に示したが、上記のような中耳腔貯溜液と比較して興味があるのは、 S_{β} 分画の認められないことである。髄液では髄膜炎の場合に S_{β} 分画の出現する場合があります、炎症によってこの分画の透過性が高まったものと考えられることができるであろう。ただ中耳腔

図3 正常髄液の泳動像

貯溜液の場合には、これが耳管カタルに由来するものである点に多少の問題が残る。これに対し、中耳腔貯溜液の由来を中耳粘膜の腺性要素からの積極的分泌であるとするならば、貯溜液中に血清中にはみられない蛋白分画が認められる可能性もあるであろう。本実験の結果からはすでに述べたように中耳腔貯溜液中には血清に見られない分画は認められなかった。この点からみれば中耳腔貯溜液は血清に由来するものと考えてよいであろう。

要 約

耳管カタル時に生じた中耳腔貯溜液 5 例を同一人の血清と同時に泳動し、比較検討した。貯溜液では haptoglobin, S_{α_2} -macroglobulin および S_{β} -lipoprotein のような高分子の蛋白分画が不明瞭となるか消失していた。また γ -glob は濃厚に認められた。

終りに臨み、たえず御鞭撻御激励と御校閲を賜った恩師本庶正一教授、ならびに終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜った生化学教室中村正二郎教授に深甚なる謝意を捧げる。

本論文の要旨は昭和39年度日本耳鼻咽喉科学会九州・長崎・山口三地方会合同学術講演会で口演した。

文 献

- 1) Bortnick, E., Proud, G. O. and Kirchner, F. R.: Arch. Otolaryng. **80**, 297 (1964)
- 2) Lawsonm L. J.: Arch. Otolaryng. **6**, 346 (1927)
- 3) Singleton, J. D.: Laryngoscope **66**, 293* (1956)
- 4) Boor, S. V.: Arch. Otolaryng. **75**, 130 (1962)
- 5) Senturia, B. H., Gessert, C. F., Carr, C. D. and Baumann, E. S.: Ann. Otol. Rhin. Laryng. **67**, 440 (1958)
- 6) Lowy, K.: Mschr. Ohrenheilk. **72**, 40 (1938)
- 7) Senturia, B. H. et al.: Ann. Otol. Rhin. Laryng. **68**, 1017 (1959)
- 8) Bendek, G. A.: Arch. Otolaryng. **78**, 33 (1963)
- 9) Friedmann, I.: J. Clin. Path. **9**, 229 (1946)
- 10) Friedmann, I.: J. Laryng. Otol. **69**, 588 (1955)

- 11) Schlander, E.: Monatsschr. Ohrenh. **66**, 278 (1932)
- 12) Ivstam, B.: Acta Oto-laryng. **44**, 274 (1954)
- 13) Robinson, J. M.: South. Med. Assn. **35**, 815 (1942)
- 14) Hoople, G. D.: Laryngoscope **60**, 315 (1950)
- 15) 中村正二郎: 最新医学 **19**, 827 (1964)
- 16) Grabar, P. and Williamus, L.: Bioch. Biophys. Acta **10**, 193 (1953)
- 17) Smithies, O.: Biochem. J. **61**, 629 (1955)
- 18) Raymond, S. and Weintraub, L.: Science **130**, 771 (1959)
- 19) Raymond, S.: Clin. Chem. **8**, 455 (1962)
- 20) Davis, B. J. and Ornstein, L.: preprint by Distillation Products Industries (1962)
- 21) 中村正二郎, 茂木五郎: 生物々化 **9**, 97 (1963)
- 22) 茂木五郎, 青柳竜平, 鈴野亮輔, 分山敏郎, 中村正二郎: 生物々化 **10**, 95 (1964)
- 23) 麻上義文, 茂木五郎, 佐々木石根, 青柳竜平, 中村正二郎: 生物々化 **10**, 98 (1964)
- 24) 麻上義文, 中村敬三, 茂木五郎, 中村正二郎: 神経研究の進歩 **8**, 187 (1964)
- 25) 茂木五郎, 中村正二郎, 麻上義文: 第14回電気泳動学会春季大会
- 26) 諸方 正, 茂木五郎: 耳鼻臨 **57**, 411 (1964)
- 27) 茂木五郎: 山口医学 **13**, 171 (1964)
- 28) Ivstam, B.: Kungl. Fysiograf. Sallskap; Lund, Förhandlingar **22**, 3; 1 (1952) cit from (29)
- 29) Carlson, L. A. and Lökk, T.: Scand. J. Clin. Lab. Invest. **7**, 43 (1955)
- 30) 上山千鶴: 日耳鼻会報 **62**, 2645 (1959)
- 31) Hopp, E. S., Elevitch, F. R., Pumphrey, R. E. and Irving, T. E.: Laryngoscope **74**, 1149 (1964)
- 32) Poulik, M. D.: J. Immu. **83**, 502 (1959)
- 33) Marney, A.: Nature **191**, 74 (1962)
- 34) Hermans, P. E., Beetham, W. P., McGuckin, W. F. and McKenzie, B. F.: Proc. Staff Meet. Mayo Clinic **37**, 311 (1962)
- 35) 麻上義文, 茂木五郎, 青柳竜平, 稲富洋明: 第15回電気泳動学会総会