2. ヒト胎児型アルブミン: Fetal type human albumin (Alb. F)

三 好 和 夫* 西 条 一 夫*

はじめに

生体の血液,あるいは組織蛋白質の個体発生的研究は近年益々活発である。その出発点は色素異常の発見と,これに関連して研究された同じく色素の個体発生的な把握 (Hb A に対する Hb F の認識) である。臨床医学の立場からは,この種の研究がある種の疾患,例えば thalassemia,あるいは familial fetal hemoglobinemia のごときものの発生や, pathogenesis と密接にからまっている点に興味をいだかれる。私たちは7~8年前より,これら色素に関する研究成果にヒントをえて,ヒト胎児アルブミンにつき,これが正常成人のものとはことなるのではないかと考えたから,一連の実験を行な

てきた¹⁻¹³⁾。この結果,現在,胎児の alb は成人のものとは物理化学的性状をことにしており,両者はそれぞれ胎児型アルブミン (Alb F),成人型アルブミン (Alb A) として区別されるべきであると考えている。

実験方法,ならびに実験成績

以下,私達のえている Alb F に関する知見の概略を研究主題別に示す。なお,各実験において,胎児血清とは満期安産の正常分娩で,臍帯搏動停止直後にえた臍帯血血清を意味する。また,alb の分離は,硫酸塩析法, Starch block 電気泳動法, エタノール分画法等を適宜用いて行なった。

1) アルブミンの酵素分解^{1,2,3,5,7)}

図1 Enzymatic hydrolysis of human serum albumin

図1は正常成人,ならびに胎児血清 alb の一定蛋白量溶液の,さらに10~160倍倍数希釈したものに,細菌プロテアーゼ(ナガーゼ),ないしトリプシンの一定単位を,37°C,60分間,それぞれ pH 7.1 で作用させた

ものである。この際生じた加水分解物生成量を波長278 mμで測定してある。結果は図のごとく,細菌プロテアーゼ分解,トリプシン分解いずれの場合においても,胎児 alb は正常成人 alb にくらべて加水分解物生成量が少

* Kazuo Miyoshi and Kazuo Saijo, 徳島大学医学部第1内科

なく、酵素分解をうけにくい（酵素的被分解性が小）ことを知った。

2) アルカリ変性アルブミンの酵素分解^{1,2,3,5,7)}

図2は、あらかじめ1N NaOH でもってアルカリ処理を施した alb について、1) の実験同様、酵素分解を実施した成績である。この場合、アルカリ処理 alb と、

未処理 (native) alb 両者の加水分解物生成量の差をもって、alb のアルカリ変性度 (degree of albumin denaturation by NaOH) として表現してある。結果は図に示す通り、細菌プロテアーゼ分解、トリプシン分解いずれの場合においても、胎児 alb は成人 alb にくらべて低い値をとり、胎児 alb は成人のものよりもアルカリ変性を

図2 Enzymatic hydrolysis of alkali denatured albumin
Bacterial protease

うけ難い（アルカリ抵抗性が大）という。

以上の所見は、私達が1959年¹⁾、これをもって胎児の alb は、胎児型アルブミン fetal type human albumin (Alb F) として、成人型アルブミン adult type human albumin (Alb A) とは区別すべきことを提唱したところである。

3) Hydroxylapatite, および DEAE セルローズ・カラムクロマトグラフィによる検討

Hydroxylapatite¹⁴⁾ カラムに、alb 試料（硫酸塩析法、starch block 電気泳動法、およびエタノール分画法によってえた。図3は、この中塩析 alb についての成績である）を添加し、0.07, 0.11, および 0.40M 磷酸緩衝液で stepwise に流出させた。結果は図3に示すように、Alb A では3個のフラクション (Fr. I, II, III) が出現する（図3上段）。これに対して Alb F では、Fr. I のピークのみがみられ、Fr. II, Fr. III はみとめられない（図3下段）。別に、同様の実験を starch block 電気泳動法、エタノール分画法でえた alb についても行なっている

が、上述塩析 alb におけるのと同様の成績がえられた。

また、DEAE セルローズ・カラムにおいても前述同様のパターンをえている。以上要約すれば、Alb A は Alb F よりも、Hydroxylapatite, DEAE セルローズ等に吸着し難いということである。

つぎに、アルカリ変性処理 alb について、Hydroxylapatite カラムクロマトグラフィを実施した（図4）。この場合、Alb A においては、native alb での主成分 Fr. I が著明に減少し、逆に微少成分の Fr. III が著しく増加する。しかるに Alb F では、native の場合ほとんどみとめられなかった Fr. II, Fr. III が出現してくるが、しかし、Fr. III の増加は Alb A にくらべてはるかに少ない（図4下段）。また別に、bacterial protease 処理 alb においても、Alb F は Alb A よりもこうむる吸着性の変化が少ない成績がえられた。

4) Alb F の異性化平衡における特性

図5は、Alb F の各種 pH 溶液中における Tiselius 電気泳動像の一部を示したものである。ペロナル緩衝液

图 3 Chromatographic elution patterns of Alb A (upper) and Alb F (lower)
Column: 1.5×12 cm
Hydroxylapatite

图 5 Electrophoretic patterns of Alb F at various pH values (Human albumin)

图 4 Chromatographic elution patterns of alkali denatured Alb A (upper) and Alb F (lower)
Column: 1.5×12 cm
Hydroxylapatite

图 6 Comparison of percentages of N form in Alb A and Alb F at various pH values (Human albumin)

(pH 8.6), および酢酸緩衝液 (pH 3.1~5.1) を用い, 日立 HT-DI 型装置で, 20°C, 5mA の条件で 40-90 分間泳動した。これによると, alb 試料は図に示す通り, 易動度の早いものと, おそいものの 2 成分にわかれる (これらは, 青木, Foster^{15, 16)} らのいう F 成分, N 成分にそれぞれ相当すると考えられる)。

Alb A, Alb F の全試料 (各 24 例をそれぞれ 2~3 種類のことなった pH 緩衝液中で泳動) についてえた泳動像より, 上記 N 成分を計測しさらにこれより異性化平衡曲線を求めた。図 6 は, このようにしてえた 2 つの異性化平衡曲線を重ねてえがいたものである。両曲線は一致せず, Alb F は Alb A のものよりも酸性側にずれ, pH 3.6 附近で交差する。

異性化平衡理論^{15, 16)} によれば, N 成分, F 成分間には, $N + nH^+ \rightleftharpoons F$ なる関係が成立しているという (H^+ は水素イオン, n はイオン数)。表 1 は, Alb F の N 成分実測値 (%) と, n をそれぞれ 2, 2.5, 3 と仮定した

Table 1 Comparison of the percentages of the N form of Alb F from experimental data and values calculated using the equation: $N + nH^+ \rightleftharpoons F$ (mid-point pH 3.95) (Human albumin)

pH	Experimental data	Calculated for		
		$N + 2H^+ \rightleftharpoons F$	$N + 2.5H^+ \rightleftharpoons F$	$N + 3H^+ \rightleftharpoons F$
3.0	0	1.25	0	0
3.2	0	3.86	1.3	0.56
3.4	4.75	7.4	4.0	2.23
3.6	11.0	15.9	11.8	8.13
3.85	34.5	32.0	34.5	37.5
4.03	62.0	60.0	62.0	64.0
4.2	80.3	76.1	80.6	84.8
4.3	89.5	83.4	87.7	91.9
4.6	97.2	95.8	97.7	99.7
4.8	99.9	98.8	99.3	99.9
5.0	100	99.2	100	100

とき計算される理論値をならべたものである。各種 pH 溶液中での N 成分実測値は, $n=2.5$ としたときの理論値にほぼ一致した。この場合, $N + 2.5 H^+ \rightleftharpoons F$ なる関係が成立しており, 2 個の水素イオンと結合している alb 分子と, 3 個の水素イオンと結合している分子とが, ほぼ等量混在しているものと推測される。Alb A につき同様にして求めた n の数は 2 であり, 従ってこの場合, alb 分子は 2 個の水素イオンと結合しているものと考えられる (この成績は, 堀, 青木らの報告¹⁷⁾ と一致して

いる)。また, 新生児出産時の臍帯血血清 alb 分子中, $n=3$ のもののあることから, ひるがえって胎生初期の alb 分子はすべて $n=3$ のもののみであることが充分考え得られる。この意味から, 本来の Alb F は, $n=3$ の alb であるといいうる (異性化平衡に関して, 種々の御助言をいただいた青木幸一郎元徳大工学部教授に厚く感謝いたします)。

5) 免疫学的検討⁸⁾

Alb A, Alb F それぞれでもって免疫してえた抗家兔血清を用い, Ouchterlony 法で検討した。その結果, 両 alb の抗原性に差異は認めなかった。

6) Alb F の出生後の推移に関する観察と, 各種疾患時における検討^{4, 6, 12)}

図 7 Correlation of the degree of albumin denaturation by sodium hydroxide to hemoglobin F percentage (Digestion by bacterial protease)

図 7 は, Alb F をあらわす一つの指標として, alb のアルカリ変性度を縦軸にとり, 横軸に同一血液の赤血球について Singer 法により求めた Hb F 量をとって, これら両者の関係をみたものである。臍帯血のほか, 乳児, 未熟児についても調べた。また, 図には familial fetal hemoglobinemia, thalassemia minor 各 2 例の成績も記入してある (これら症例の血液の検索は, 京都府立医大増田内科, 金沢大学医学部村上内科の方々の御好意によったものである)。図から, アルカリ変性度の低いアルブ

ミンにおいては Hb F 含量が高く、逆にアルカリ変性度の高いものにおいては Hb F 含量が低いといえる。個体発生学的には、生後 4～5 カ月に、Hb F が Hb A に置きかわるのに平行して、Alb F が Alb A に置換するのではないかと考えられる。

この Alb F は、familial fetal hemoglobinemia, thalassemia 症例では高値に存在する。しかし、その他の各種疾患時（肝硬変症 10 例、ネフローゼ症候群 4 例、急性骨髄性、および慢性淋巴性白血病各 3 例、溶血性貧血 3 例、悪性貧血、骨髓腫各 2 例について検討）には、Alb F の増加存在はみとめなかった。

む す び

以上、私達のえている胎児型アルブミン (Alb F) に関する知見の概略をしるした。最近、人の alb に関する genetic control の知見は、double albuminemia の発見、検索によって深められつつあり、この意味で私達のとりあげている Alb F の問題も意義が大きいと考える。

この研究は、主として教室の柏木忠、小谷雄二両君の協力によってえたものである。

文 献

- 1) 三好和夫、西条一夫、小谷雄二、高野尚之：胎児血清アルブミンの特異性について、胎児型アルブミン (Alb F) の提唱、日血会誌、**22**：801～802, (1959)
- 2) 西条一夫：血漿蛋白質の酵素分解に関する研究、特に臍帯血アルブミンの特異性について、四国医誌、**16**：568～591, (1960)
- 3) 三好和夫、大野文俊、西条一夫、柏木 忠、小谷雄二、高野尚之、中田道雄、吉松正明：血漿蛋白質と蛋白病に関する研究、胎児型アルブミン (アルブミン F) の存在について、日内誌、**49**：490～491, (1960)
- 4) 小谷雄二、西条一夫、柏木 忠、中田道雄、三好和夫：胎児型アルブミン (アルブミン F) に関する研究、各種特殊疾患についての検討、日血会誌、**23**：488～489, (1960)
- 5) Miyoshi, K., Saijo, K., Kashiwagi, T., Kotani, Y., Nakata, M., and Yoshimatsu, M.: On the existence of Albumin F, a fetal type of albumin, Tokushima J. Exp. Med., **7**：320-330, (1961)
- 6) 三好和夫、柏木 忠、西条一夫、小谷雄二、中田道雄、栗生陽次郎：胎児型アルブミン (アルブミン F) に関する研究、Column chromatography による検索、日血会誌、**24**：377～377, (1961)
- 7) Miyoshi, K., Saijo, K., Kashiwagi, T., Kotani, Y., Kôno, H., Nakata, M., Yoshimatsu, M.: On the existence of "Albumin F", a fetal type of albumin, Proceedings of the VIIIth International Congress of Hematology, **3**：1906-1909, Pan-Pacific Press, Tokyo, (1962)
- 8) 小谷雄二、西条一夫、栗生陽次郎、中野益弘、上島宏一、東原正幸、宮岡輝夫、村田友常、三好和夫：胎児型アルブミン (Alb F) の免疫学的検索、日血会誌、**26**：480～481, (1962)
- 9) 小谷雄二、西条一夫、柏木 忠、吉松正明、栗生陽次郎、大島康男、中野益弘、川井尚臣、三宅正夫、三好和夫：胎児型アルブミン (Alb-F) の電気泳動的検索成績——とくに異性化平衡について——、日血会誌、**27**：364～365, (1964)
- 10) 三好和夫、西条一夫、小谷雄二、柏木忠、吉松正明、栗生陽次郎、大島康男、中野益弘、三宅正夫、川井尚臣：人胎児型アルブミン (Alb-F) の電気泳動的検索、生物物理化学、**11**：69～70, (1965)
- 11) 柏木 忠、アルブミン F (人胎児型アルブミン) に関する研究、カラムクロマトグラフィによる検索成績、四国医誌、**22**：413～426, (1966)
- 12) 小谷雄二：人胎児型アルブミン (Alb-F) の研究、第 1 編 Alb-F の異性化平衡における特性、第 2 編乳幼児および各種疾患時における Alb-F 有無の検討、四国医誌、**22**：427～440, (1960)
- 13) Miyoshi, K., Saijo, K., Kotani, Y., Kashiwagi, T., and Kawai, H.: Characteristic properties of fetal type human albumin (Alb F) in isomerization equilibrium, Tokushima J. Exp. Med., **13**：121～128 (1966)
- 14) Tiselius, A., Hjertén, S., and Levin, Ö.: Protein chromatography on calcium phosphate columns, Arch. Biochem. Biophys., **65**：132-155, (1956)
- 15) Aoki, K., and Foster, J. F.: The effect of ion binding on protein structure. I. Influence of acetate on the electrophoretic behaviour of serum albumin, J. Amer. Chem. Soc., **78**：3538-3539, (1956)
- 16) Aoki, K., and Foster, J. F., Electrophoretic behaviour of bovine plasma albumin at low pH, J. Amer. Chem. Soc., **79**：3385-3393, (1957)
- 17) Hori, J., and Aoki, K.: Some observations on the isomerization of horse and human serum albumins, Arch. Biochem. Biophys., **88**：232-240 (1960)