〔報 告〕

電気泳動像に見られたヒト血清アルブミンと
ペニシリン G の相互作用*

江 沢 敏 一**・北 村 元 仕**

I. 結 言

亜急性細菌性心内膜炎の患者血清の電気泳動で、alb より陽極側に出現する蛋白質を観察した。alb 分画と連続して陽極側に広がる分画は、セルローズアセテート膜および寒天電気泳動で明瞭に認められた。

免疫電気泳動および試験管内実験の結果、この分画は患者に大量投与されたペニシリン G が、血清 alb と結合して移動速度を陽極側に変えたものであることが判明した。

同じ現象は最近、Arvan らによって報告されたが、著者らの実験では alb の他に pre-alb にも同様の移動速度の変化が認められた。

II. 実 験 方 法

1. セルローズアセテート (Separax) 膜による泳動条件

電気泳動標準操作法に準じた¹⁾。

2. 寒天電気泳動²⁾

ペロナール塩酸緩衝液 pH 8.4, $\mu=0.04$, 6mA/cm, 15°C で 80 分間泳動, 中外特殊寒天使用。

3. 免疫電気泳動³⁾

ペロナール緩衝液 pH 8.6, $\mu=0.05$, 2.5mA/cm, 45 分間泳動, 中外特殊寒天使用。

抗血清は anti-whole human serum (Hyland), anti-albumin, anti- α_1 -lipoprotein, anti- α_2 -lipoprotein serum (Behringwerke) を使用。

4. 超遠心分析

リン酸緩衝液 pH 7.8, $\mu=0.1$, 蛋白濃度 1%, 50,000 rpm, Phywe U-50L (空気駆動型) を使用。

5. ペニシリン G (Pc-G) 添加実験

最終濃度にして 2,500 U から 50,000 U/血清 1ml までの Pc-G カリウム塩 (明治製薬製) を正常ヒト血清に添加。対照として Pc-G を添加した血清と同一の蛋白濃

度となる様に水で希釈した同じ血清を用いた。共に 37°C で 24 時間 incubate した後、電気泳動を行なった。

III. 実 験 結 果

1) Separax 膜を用いる蛋白分画検査において、亜急性細菌性心内膜炎 (SBE) 患者血清の泳動像で alb の陽極側に異常蛋白が出現した (図 1-a の斜線部分)。この染色される部分は泳動条件 (試料塗付の位置及び緩衝液の pH 等) を変えても変化なく、又 alb とはっきり分離することもなかった。支持体を寒天に代えたところセルローズアセテートよりも顕著に alb の陽極側に BPB 及び Ponceau 3R で染色される部分が見られた (図 1-b)。

図 1

2) この染色域が何であるかをみるため患者血清に抗ヒトウサギ全血を用いて免疫電気泳動 (IEP) を実施した。結果は図 2 で、この中には正常ヒト血清の蛋白質以外の沈降線はなかった。しかし注目されるのは陽極側へ引きのばされて、double humped 状を形成している alb の沈降線である。染色部分はこの引きのばされた alb の線に一致した。

3) この SBE 患者は治療のため総計 2,037,000,000

* Electrophoretic study on an interaction between human serum albumin and penicillin G

** Toshikazu Ezawa, Motoshi Kitamura, 虎の門病院生化学科

単位の Pc-G カリウム塩が投与されていた。Pc-G は alb と結合する上それ自体電荷は陰性であることから、alb の一部が陽極側へ移動したことは alb と Pc-G の相互作用による現象と思われた。そこで上記の濃度範囲の Pc-G を正常ヒト血清に添加してその血清の泳動を試みた結果、25,000 U/1 ml 血清のとき患者血清と類似のパターンを得ることが出来た。それ以上の PcG 濃度では濃くなるに従い alb 全体の移動速度が大きくなってだんだん陽極側へ近くなって行った。

図2 上コントロール 下 SBE 患者血清
抗血清: anti-whole human serum

4) PcG の大量投与によって alb の一部が移動速度を変えることが別の SBE 患者の follow up で判明した。

PcG の大量投与で治療を始める前を対照として、治療開始と共に電気泳動像の変化を追跡した。その結果約2週間後やはり alb の陽極側に前と同じ現象が現われた(図3, 下が対照)。

図3 上は治療開始後2週間目の血清
下は治療開始前

5) 患者血清を超遠心分析したがそれは正常ヒト血清のパターンと同じであった。IEP の結果と考え合わせ、染色される部分はやはり alb そのものと考えられる。

IV. 考 察

Pc と alb 相互作用は alb の vehicle function に伴い以前から知られているが、ヒト血清の電気泳動像にその

図4

	上	下	抗 血 清
a	コントロール	PcG 添加血清	anti-whole human serum
b	"	"	anti-albumin
c	"	"	anti- α_1 -lipoprotein
d	"	"	anti- α_2 -lipoprotein

影響が現われるという報告がやはりごく最近, Arvan ら⁴⁾によりなされた。Pc と alb の結合は Chow ら⁵⁾はそれが弱い可逆的な反応であるとしている。しかし、今までの普通の方法(限外濾過, 平衡透析等)は結合についてのわずかな知見しか与えてくれないが, Fischer ら⁶⁾は NMR スペクトルの変化及び阻害実験より PcG のフェニル基が alb との結合部位であることを示した。問題の染色部分が alb より陽極側に出現することは PcG のフェニル基が alb と結合すること, 及び PcG の母核(6-amino-penicillanic acid, 6-APA)にも幾つかの水素結合が可能な部位があるので, この complex が alb よりも負電荷の大きい化合物となったためではないかと思われる。しかしフェニル基を持った PcG 側鎖類似化合物でも alb と作用すること, 更に PcG は生理的条件下で分解し幾つかの崩壊産物を作ること⁷⁾, 肝臓中の酵素には Pc を不活性化するものがあること⁸⁾などから, 患者血清中で alb と作用したものが, PcG そのものかあるいはフェニル基を有する崩壊産物であるのかは不明である。しかしながら, Arvan らは alb に結合した PcG は penicillinase により分解されないことを示し, 著者らの実験でも penicillinase による 3 濃度ディスク法で行なった試験でも検出されなかった。

IEP において alb と低分子化合物が結合して double humped 状の沈降線を作ることは, Schen ら⁹⁾がヒト血清に Evans blue (EB) 色素を 50 mg/dl 添加した時に認めている。この時同時に, alb 以外に α_1 -lipoprotein にも EB が結合してその移動速度を変えることが見だされた。最近, 血清蛋白質中には alb 以外にも色素などの化合物を結合する能力がリポ蛋白にもあることが, 注目されてきた¹⁰⁾。著者らは, α_1 - と α_2 -lipoprotein に対する特異抗血清を用い PcG 添加血清を調べたが, どちらにも変化は認められなかった(図-4c, 4d)。PcG 添加血清を全血清抗血清で反応させたところ明らかに pre-alb の

線は移動速度を変えていた(図-4-a)。これは患者血清でははっきり認められなかった。以上の結果から, 電気泳動的には異種の蛋白質に見える alb と alb-PcG complex は免疫的には同じ蛋白質であることを示している。

抽出法によって PcG が alb の Ponceau 3R に対する色素結合能にどのような影響を与えるかを調べたが, alb と alb-PcG complex の間には同色素に対する差は認められなかった。このことは PcG と alb の結合は Ponceau 3R とは異なった部位で行なわれることを想像させる。あるいは PcG の蛋白質への結合は alb の conformation に大きな変化を与えないために色素が結合するのではないかと思う。最後に, 臨床検査の立場から, この現象は静注用造影剤¹¹⁾の様に著しい蛋白分画値への影響を与えるものではないことがわかった。

終りに臨み, 種々御指導及び御手伝いをいただいた当院血液学科清水勝先生, 元当生化学検査室西田武雄氏, 当生化学検査室渡部昭子氏, 細菌検査室佐久一枝氏, 上智大学理工学部生化学教室勝見世英子氏に深謝する。

参 考 文 献

- 1) 小川恕人, 他: 生物物理化学, **11**, 351 (1966)
- 2) 吉田光孝, 他: 生物物理化学, **11**, 345 (1966)
- 3) 松橋 直, 他: 臨床病理特集 15 号, 113 (1966)
- 4) Arvan, D. et al: Clin. Chim. Acta, **22**, 211 (1968)
- 5) B. F. chow, et al: Science, **101**, 67 (1945)
- 6) Fischer, J. J. et al: J. Amer. Chem. Soc., **87**, 3237 (1965)
- 7) Seifter, E. et al: Nature, **217**, 1055 (1968)
- 8) Kind, A. C. et al: J. Lab. Clin. Med., **71**, 728 (1968)
- 9) Schen, R. J. et al: Clin. Chim. Acta, **16**, 445 (1967)
- 10) Watson, D.: Clin. Chim. Acta, **15**, 121 (1967)
- 11) 河合 忠: 最新医学, **19**, 1001 (1964)