細胞電気泳動法の臨床的応用*

橋 本 信 也**

はじめに

細胞電気泳動法は今世紀初頭1902年 Ralph Lillie が顕微鏡下、等張底糖溶液中で赤血球、白血球、筋肉細胞を電気泳動したのが、その歴史のはじまりであるといわれている。¹⁾ 今日の細胞電気泳動法の基礎を築いたのは Abramson, Ambrose, Ruhstroth-Bauer といった人達であり、1965年にロンドンで開かれた細胞電気泳動法に関するシンポジウムは、細胞電気泳動法の歴史にとって1つの epoch making な出来事であった。

現在細胞電気泳動の装置には多くの種類が開発され、その応用もさまざまな領域におよんでいる。本稿では細胞電気泳動法の臨床的応用と題して、現在までに得られている知見について述べることにする。

細胞電気泳動法の基礎

細胞電気泳動法を理解する上で、まずその理論を簡単にふれておく。細胞電気泳動法は細胞を適当な電解質溶液内に浮遊させ、これに電場を与えて細胞が陽極側に移動する速度を観察する方法であるが、細胞の泳動速度は細胞膜表面の荷電密度に比例する。Helmholz-Smoluchowsky の公式

$$v = \epsilon H \xi / 4 \pi \eta$$

v : 電気泳動速度, ϵ : 誘電率, H : 電場の強さ,

ξ : 表面電位 (Zeta ポテンシャル), η : メジウムの粘度

は細胞電気泳動法でも基本的な理論として利用され、電気泳動の速度は細胞の表面電位に比例することを意味している。厳密な意味では表面電位と表面荷電密度とは異なり、表面荷電密度には Gouy-Chapman の公式*** が

利用される。しかし、ふつう細胞電気泳動では細胞の荷電密度を絶対値として求めることはせず、Helmholz-Smoluchowsky の公式により細胞の表面電位を測定することになっている。

実際の細胞電気泳動度の算定は、細胞の泳動する速度を電位勾配で割った値で求めている。単位は $\mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ で表わし、電位勾配は電流量と緩衝液の比電導度によりオームの式によって計算される。結局、細胞の泳動する時間を測定することにより、泳動度が算出できるわけである。この算定法は泳動管が円筒型のときに適用できるわけであるが、四角型泳動管では管の断面積が複雑であり別の式を用いる必要がある。ふつうは既知の泳動度をもつ細胞、たとえばラット赤血球を実験の度毎に測定してその電気泳動度と比較して算定する。²⁾

細胞電気泳動法の種類

現在用いられている細胞電気泳動の種類とその特徴を Table 1 に示す。

Analytical cell microelectrophoresis は cytopherometer とも呼ばれ、細胞を顕微鏡下で観察しながらその泳動時間を測定する方法である。細胞電気泳動中もっともよく普及している。

Free flow electrophoresis は細胞を電気泳動度の差で分離し、泳動しながら試験管に分画採取する分離用である。

表面電位測定装置は、レーザー回転プリズム法という方法を取り入れた Zeta ポテンシャル測定装置で、細胞の泳動を顕微鏡下で観察することで Zeta ポテンシャルがデジタル表示されるものである。

* The clinical study of cell electrophoretic technique.

昭和55年6月7日、第30回電気泳動学会春季大会(野口英世記念会館)における教育講演。

** Nobuya Hashimoto, 東京慈恵会医科大学第3内科。

*** Gouy-Chapman の公式 $\sigma = 2 \cdot \left(\frac{NDKT}{\pi \times 2000} \right)^{1/2} \sin Z \left(\frac{e \xi}{2KT} \right)$

σ : 表面荷電密度 ($\text{e.s.u.}/\text{cm}^2$), N : アボカドロ定数 (6.03×10^{23}), D : 誘電率, K : ボルツマン定数 ($1.38 \times 10^{-16} \text{ erg} \cdot \text{deg}^{-1}$), T : 絶対温度, e : 1 コの電子の荷電量 ($1.60 \times 10^{-19} \text{ coul.}$), Z : メジウムの塩のイオン価数, I : メジウムの塩のモル濃度, ξ : 表面電位。

Table 1. 細胞電気泳動法の種類と特徴.

種 類	目 的	方 法	表 現 法	製 作
Analytical cell microelectrophoresis (Cytopherometer)	分 析 用	顕微鏡下で細胞の泳動時間を測定する	$\mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$	杉浦研 Zeiss Rank Broth
Free flow electrophoresis	分 離 用	泳動度の差で分離する	分画試験管別に細胞数を算定	Bender-Hobein Desaga
Zeta potential measurement	分 析 用	レーザー回転プリズム法	Zeta-ポテンシャル ($-\text{mV}$)	Pen Kem
Automated analytical particle electrophoresis (AAPE)	分 析 用	レーザー回転グレーティング法	自動記録装置で histogram が描かれる $\mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$	Pen Kem
		レーザードップラー法		General Electric Biotechnik
Density gradient electrophoresis	分 離 用	Density gradient の column 内で細胞を分離	fraction collector で細胞を分画	Buchler
その他 Endless-belt electrophoresis, Isoelectric focusing など				

Automated analytical particle electrophoresis (AAPE) は、多数の細胞を短時間で測定し、その泳動度が自動的に histogram として記録される画期的な方法である。その原理はレーザー回転グレーティング法、レーザードップラー法などが考案されている。1979年10月、ミュンヘンで開かれた細胞電気泳動法に関する国際会議 Electrokinetic properties and functions of bioparticles でも、この種の装置が市販品、試作品を含めて多数展示された。

Density gradient electrophoresis は Catsimpoolas が最近開発したものである。Sucrose と Ficoll で density gradient にした column の中で細胞を電気泳動し、fraction collector で泳動後の細胞を分画採取するものである。

他に endless belt electrophoresis, isoelectric focusing による細胞の分離なども報告されているが、未だ普及をみていない。

以下各種細胞電気泳動の概略と応用についてのべる。

1. 分析用細胞電気泳動

Analytical cell microelectrophoresis

この方法については既に度々報告した通りである。^{3,4)} 本法を実施するに際して注意すべき2, 3の点を挙げると、1つは泳動管の問題がある。分析用細胞電気泳動装置に用いられる泳動用チェンバーには2種類あるが、その用途に応じて使い分ける必要がある。それぞれの泳動管の特徴を Table 2 に掲げる。

細胞電気泳動を行う際にもう1つ重要なことは静止面である。細胞を浮遊させている電解質溶液に電流を流すと、電解質溶液そのものも電気浸透現象により流れが生じる。Fig. 1 に示すように泳動用チェンバーのガラス管の表面は陰性に荷電しており、管内に電解質溶液を入れると解離した陽イオンは管壁に引き寄せられ、管内の中央部分は陰イオンが多く存在する。これに電流を流すと管壁周辺の陽イオンは陰極に向かって移動し、管の中央部

Table 2. 四角型、円筒型泳動管使用上の差.

	四 角 型	円 筒 型
細胞の識別	可 能	困 難
泳動管内容量	大	小
細胞数	多	少
左右泳動時間の差	大	小
泳 動 度	標準ラット赤血球泳動度と比較	$\frac{\pi r^2 \cdot l}{iR} \times V (\mu/\text{sec})$

Fig. 1. 電気浸透によるメジウムの流れと静止面.

分は陰イオンが多いので逆に陽極に向かって移動する。したがって、管の壁に近いところと中央部分では、それぞれ反対の方向に向かって液は流れるが、管は両端が閉じてあるので各極で逆転し、全体として矢印に示すような流れが生じることになる。この流れは管の壁と中央では正反対の方向にあり、両者の境界面では流れは起っていないはずである。この流れのないところが静止面であり、この静止面に存在する細胞の泳動のみを測定することが細胞電気泳動では重要なことである。静止面を決定するためには、円筒型、四角型でそれぞれ計算式があるが、実際は各泳動管固有の静止面は既に計算されているから、測定に際しその度に顕微鏡の焦点を静止面に合わせるだけでよいようになっている。この静止面にレンズの焦点を合わせ、焦点のあった細胞の泳動のみを観察するわけである。

この方法を用いてヒトの全血液について行った Ruhenstroth-Bauer の結果を Fig. 2 に示す。⁵⁾ 赤血球は $1.270 \mu\text{sec/V/cm}$ 、顆粒球は $0.874 \mu\text{sec/V/cm}$ 、リンパ球はその中間に位置し $1.009 \mu\text{sec/V/cm}$ である。

Fig. 2. Das Hämozytopherogramm eines Gesunden.⁵⁾

ヒトの赤血球の細胞電気泳動的検討については多くの報告があり、これまでに知られている成績を一括して Table 3 に示す。その数値は用いた緩衝液によって当然異なる。

加齢による赤血球電気泳動の変化はヒト、ラットで認められており、加齢による赤血球表面陰性荷電の低下は、加齢に伴う細胞構成成分、機能の変化を解明する上で興味をもたれている。

ヒト血小板の細胞電気泳動度を Table 4 に示す。その値は同じメジウムを用いても報告者によって多少異なるようである。

ヒトリンパ球の細胞電気泳動については正常者 100 例の末梢血からリンパ球を Ficoll-Conray によって分離し、総計 2,040 個について cytopherogram を描いた成績を Fig. 3 に示す。電気泳動度は平均 $0.977 \mu\text{sec/V/cm}$ であった。個々のリンパ球についてみると、泳動上かなり広い分布を示すことが認められる。リンパ球は T 細胞、B 細胞に大別され、T 細胞はヒツジ赤血球に対するリセプターをもち、B 細胞は表面免疫グロブリンを保有している。ヒトリンパ球を抗ヒト免疫グロブリン家兎抗体で感作して細胞電気泳動を行うと、泳動度の変化として 23.8% から 30.4% の泳動低下細胞群を認めた (Table 5)。これは恰度表面免疫グロブリン陽性細胞の

Table 4. ヒト血小板の電気泳動度。

報 告 者	緩 衝 液	E P M ($\mu\text{m/sec/V/cm}$)
Gröttum (1968)	血 漿	1.09 ± 0.04
Rutty (1969)	血 漿	0.961
Ruhenstroth-Bauer (1961)	リ ン 酸	1.120 ± 0.50
Karpinen (1970)	リ ン 酸	1.207

Table 3. ヒト赤血球電気泳動度。

報 告 者	緩 衝 液	泳 動 管	E P M ($\mu\text{m/sec/V/cm}$)
Abramson (1929)	リ ン 酸 pH 7.4, μ 0.172	四 角 型	1.30
Furchgott (1941)	塩 化 物 pH 7.4, μ 0.145	四 角 型	1.10
McQuillen (1950)	リ ン 酸 μ 0.172	円 筒 型	1.32 ± 0.05
Hartman (1952)	リ ン 酸 μ 0.172	四 角 型	1.27
Brody (1954)	リ ン 酸 μ 0.172	四 角 型	1.28
	塩 化 物 μ 0.145	四 角 型	1.07 ± 0.02
Bangham (1958)	リ ン 酸 μ 0.172	円 筒 型	1.28 ± 0.03
	塩 化 物 μ 0.145	円 筒 型	1.07 ± 0.02
Seaman (1965)	塩 化 物 pH 7.2, μ 0.145	円 筒 型	1.18
山 田	ペロナル pH 7.0, μ 0.173	円 筒 型	1.023 ± 0.015

Fig. 3. 正常ヒトリンパ球の細胞電気泳動図。
(健康成人 100 例のリンパ球 2,040 個の
集計)

Table 5. 抗 γ -グロブリン処理リンパ球電気泳動
度の低下と表面免疫グロブリン陽性細胞
数との関係。

No.	Cells treated with anti- γ -globulin	Surface Ig bearing cells	E rosetting cells
1033	30.4%	31.5%	69.6%
1035	23.8	25.3	71.5
1036	30.0	25.7	73.9
1039	25.0	23.4	72.8

率とはほぼ同じであり、電気泳動的にもこれがB細胞であることが示唆された。

2. 無担体連続電気泳動

Free flow electrophoresis

この方法は Max Planck 研究所の Hannig 教授によって開発され、現在欧米では広く用いられている。1mmの間隔をもった2枚のガラス板に挟まれた空間を分離槽として、これを垂直に立て上方より分離用緩衝液を流し、緩衝液による無担体のカーテンを作り、その中に細胞浮遊液を注入し、緩衝液の落下方向と垂直に電場をかけ、細胞を泳動度の差で分離する方法である。Fig. 4は我々の用いている Bender Hobein 製 VaP-5 型の機構の概略である。中央の分離槽 separation chamber 内には常時緩衝液が一定の流速で落下し、上方の一点より細胞浮遊液が注入される。両端には電極槽があり電極用緩衝液は循環している。泳動度の差により分離された細胞は separation chamber の下にある試験管に分画採取され、cell counter で細胞数を算定する。泳動条件は 1cm あたり 80 V、210 mA、7°C で行った。この装置によりヒト末梢血リンパ球を分離した結果を Fig. 5 に示す。得られた細胞のT細胞、B細胞を同定した成績を Fig. 6 に示す。T細胞は E-rosette 形成法、B細胞は膜免疫蛍光

法で同定したが、試験管番号54から57まではほとんどがT細胞、試験管番号61はほとんどがB細胞で、58、59、60は両者が混在している。数の小さな試験管番号の方が

Fig. 4. 無担体連続電気泳動 (Va-P₅) の機構概略。

Fig. 5. Free-flow electrophoretic distribution of lymphocytes in 3 different donors.

Fig. 6. Percent of human T and B lymphocytes separated by free-flow electrophoresis.

泳動速度の早い細胞群、数の大きい方は遅い細胞群を意味している。

同様の成績は動物でも認められており、ここではマウスリンパ球を用いた Häyry らの実験を紹介する。⁶⁾ Fig. 7 に示す histogram の A, B, C, D, E はそれぞれ脾、リンパ節、末梢血液、骨髓、胸腺のリンパ球であるが、脾、リンパ節、末梢血では遅い泳動度をもった LMC と早い泳動度の HMC の 2 群からなるが、骨髓、胸腺は LMC だけの unimodal pattern であるという。この HMC が T 細胞であり、LMC が B 細胞であることを表面マーカーの特徴から確認しているが、胸腺が LMC の unimodal pattern を示すことについては、この LMC は thymus precursor で、末梢 T 細胞と膜表面荷電密度が異なり、僅かな HMC が mature T 細胞であろうと推論している。

3. Zeta potential 測定装置

この装置は元来、コロイド粒子表面電位測定装置として開発されたものであるが、細胞の表面電位を測定することもできる。この装置は米国 Pen Kem 社で開発さ

Fig. 7. Separation profiles of mouse lymphocytes in preparative cell electrophoresis.⁶⁾

A: CBA spleen lymphocytes, B: CBA lymph node lymphocytes, C: CBA blood lymphocytes, D: CBA bone marrow lymphocytes, E: C3H thymus cells, F: C3H thymus cells, hydrocortisone-treated animal, G: spleen lymphocytes from thymectomized, irradiated, bone marrow reconstituted C3H mice.

Fig. 8. Principle of the rotating prism method.

Fig. 9. Cytopherogram of zeta potential in normal and antiserum-treated erythrocytes.

に移動するが、この移動する細胞を顕微鏡下でみかけ上静止するまでプリズムを回転させ、その回転率から Zeta ポテンシャルが換算されるように設計されている。Zeta ポテンシャルは $-mV$ で直接デジタル表示される。正常ヒト赤血球の Zeta ポテンシャルを測定してみると平均 $-25.05 \pm 2.49 mV$ であった。⁷⁾ 赤血球を抗体で感作して、その Zeta ポテンシャルの変化を調べたのが Fig. 9 である。抗体として抗 D 血清を用いたが、抗体感作赤血球の Zeta ポテンシャルは、いずれも増加した。10 例について検討した成績ではいずれも増加し、増加率は平均 $23.01 \pm 8.24\%$ であった。赤血球を抗 D 血清で感作したとき表面電位の値が大きくなることは興味深いものと考えられる。

4. 自動分析用細胞電気泳動

Automated analytical cell electrophoresis

自動分析用細胞電気泳動は現在欧米で開発中のものを含めて幾種類があるが、ここでは我々の使用した Laser grating 方式による Laser Zee 3000 (Pen Kem) を紹介する。この装置では、細胞浮遊液を注入するだけで、すべての装作は自動的に行われ、100 個の細胞の平均電気泳動度算出に約 30 秒、 10^8 個の細胞の histogram 作製に要する時間約 5 分という驚異的なものである。その原理を Fig. 10 に示す。サンプラーで吸引された細胞はチャンパーの中で電気泳動され、レーザー光線により得られた細胞像は対物レンズで集光され、回転グレーティング上に投影される。このグレーティングの回転によって惹き起される周波数の変化と細胞の泳動速度とが関連することを利用し、チャンパー内における細胞の移動を周

れ、Laser Zee 500 として市販されているが、回転プリズム法という独特な原理を利用している。Fig. 8 はその原理を示したものである。電気泳動により細胞は陽極側

Fig. 10. Laser Zee 3000 機構の原理.

Fig. 11. Laser Zee 3000 によるヒトリンパ球のヒストグラム.

波数変換し、コンピューターにより個々の細胞の電気泳動度が算出される。

この装置によりヒトリンパ球の細胞電気泳動を行った

成績を Fig. 11 に示す。平均電気泳動度 $1.061 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ であり、 1.05 にピークを有する分画とそれより遅い分画に分かれた。

5. Density gradient electrophoresis

この方法は分離用細胞電気泳動法として最近 Massachusetts 工科大学の Catsimpoalas 教授が考案したものである。この装置は元来 polyacrylamide gel electrophoresis として市販されている Poly-Prep 200 型 (Buchler) である。その機構の概略を Fig. 12 に示す。⁸⁾ 2.5% から 6.25% の Ficoll gradient と 6.35% から 5.72% の sucrose gradient にしたものをカラムに詰め、その density gradient の上端にサンプルをのせて電気泳動を行う。泳動後, elution out から peristaltic pump によって, 分離された細胞はカラムの外へ出され, fraction collector によって分画採取されるわけである。この装置によりラット脾リンパ球を分画した Catsimpoalas らの成績を紹介する⁹⁾ (Fig. 13)。得られた試験管を5つの分画に分け, surface Ig の存在と PHA 反応性で検討すると, fraction I は PHA 反応性陽性細胞, fraction IV, V は PHA 陰性, surface Ig 陽性細胞群であったという。さらに彼らはヒト末梢血リンパ球でも同様のことを行い, T rich リンパ球でこの density gradient electrophoresis を行った¹⁰⁾ (Fig. 14)。high mobility T cell fraction である I, II 分画には $T\mu$ が多く存在し, low mobility T cell fraction である IV, V 分画に

Fig. 13. Electrophoretic separation of rat spleen T and B lymphocytes (8×10^7 cells).⁹⁾

Different aliquots from the pooled fractions I through V were assayed for Ig-positive cells and PHA stimulation.

Fig. 12. Schematic diagram of the preparative electrophoresis column (Buchler Poly-Prep 200).⁸⁾

Fig. 14. Separation of $T\mu$ and $T\gamma$ cells.¹⁰⁾

A : Electrophoretic distribution profile of human peripheral blood T lymphocytes.

B : $T\mu$ (▨), $T\gamma$ (■), and high-(□) and low-affinity (▤) E-RFC.

は $T\gamma$ が多かったという。また high affinity E-rosette 形成細胞は high mobility fraction に多く、low affinity E-rosette 形成細胞は low mobility fraction に多いことが示された。興味あることは $T\gamma$ と low affinity E-rosette 形成細胞の比率がどの fraction でもほぼ同じにみられることである。このことは low affinity E-rosette 形成細胞が IgG Fc receptor をもつ T 細胞であるという見解を裏付けるものと考えられる。Fraction III は IgG, IgM の receptor をもたない T 細胞、いわゆる $T\phi$ を多く含む分画であったという。このように、この density gradient electrophoresis はリンパ球を subset に分けることも可能であり、今後利用される可能性の高い方法であろう。

各種疾患時における細胞の電気泳動的変化

細胞電気泳動法を用いた臨床的応用は近年活発に行われてきている。とくに疾患時における細胞の電気泳動的変化は、病態を把握する上で多くの情報を提供してくれることがわかってきた。以下、臨床的に有用な細胞の電気泳動的変化について述べる。

1. 赤血球の細胞電気泳動的変化

心血管系疾患における赤血球の電気泳動的検討については Begg らが詳細に行っている。¹¹⁾ Fig. 15 の上段は血漿、下段は 1/15 M phosphate buffer を緩衝液にした場合であるが、心筋梗塞、狭心症、動脈系疾患患者赤血球は正常者に比して、いずれも低い泳動度を示し、とくに血漿を medium としたとき著明な低下がみられたという。同様のことはそれより以前に Davis らも認めており、coronary heart disease の患者赤血球は血漿を medium として電気泳動すると、正常赤血球に比べて著しい泳動度の低下がみられ、これが血清コレステロール値より指標として優れていると主張し、atheroma index と呼んだ。²⁾ しかし一方、Karppinen の報告のように、coronary heart disease 患者赤血球でも、粘度補正すると泳動度は正常赤血球とほぼ同じになり、有意の差はないという。¹³⁾ 今後の検討が必要であろう。

Table 6 は各種疾患における赤血球の電気泳動度を測定した Rottino らの報告である。¹⁴⁾ 緩衝液は veronal buffer で pH をいろいろに変えて検討している。精神科疾患、消化性潰瘍、良性腫瘍では泳動度の変化をみな

Fig. 15. 心血管系疾患における赤血球の電気泳動的変化。¹¹⁾

Table 6. Velocity of the red cell in normal persons and others with a variety of diseases.¹⁴⁾

Condition	No.	At pH 9 (μ)	At pH 7 (μ)	At pH 5.5 (μ)	At pH 4 (μ)
Normal	200	1.33 ± 0.05	1.27 ± 0.05	1.16 ± 0.04	1.08 ± 0.08
Fracture	10	1.33			
Mental disease	10	1.30			
Chr. peptic ulcer	10	1.31	1.23	1.15	1.00
Ulcerative colitis	6	1.31	1.23	1.14	1.06
Pregnancy	100	1.21 ± 0.02	1.13 ± 0.03	1.06 ± 0.03	1.00 ± 0.03
Myocardial infarc.	10	1.24	1.16	1.10	1.04
Pneumonia	10	1.17	1.12	1.07	1.03
Cirrhosis of liver	10	1.17	1.10	0.93	0.82
Encephalomalacia	10	1.16	1.10	1.09	1.01
Hodgkin's dis.	100	1.09 ± 0.05	1.05 ± 0.05	1.00 ± 0.05	0.92 ± 0.09
Chr. lymph. leuk.	4	1.03	1.08	0.96	0.94
Chr. myelog. leuk.	3	1.09	1.12	1.02	0.87
Lymphosarcoma	5	1.03	1.06	0.97	0.85
Acute leukemia	3	1.10	1.05	0.96	0.87
Cancer	200	1.16 ± 0.02	1.10 ± 0.03	1.02 ± 0.03	0.97 ± 0.03
Benign tumor	31	1.33 ± 0.03	1.23 ± 0.02	1.14 ± 0.02	1.07 ± 0.02

いが、白血病、悪性リンパ腫、癌で著しい泳動度の低下がみられている。癌患者の赤血球が何故低い泳動度を示すのか、彼らは考察を加えていない。その後この方面での追試もなく、真に診断的価値のあるものか否か現在のところ不明である。赤血球電気泳動で注目すべきことに発作性夜間血色素尿症 PNH がある。¹⁵⁾ 正常者赤血球の $1.08 \pm 0.011 \mu/\text{sec}/V/\text{cm}$ に対し、PNH 赤血球では $1.14 \pm 0.012 \mu/\text{sec}/V/\text{cm}$ と高い泳動度を有する。しかし neuraminidase 処理すると正常者赤血球も PNH 赤血球も $0.35 \mu/\text{sec}/V/\text{cm}$ と同じ値になるという。PNH 赤血球では neuraminidase 処理によって Ham test の溶血感受性が亢進する事実と考え合わせ興味深い。

2. 血小板の細胞電気泳動的变化

血小板の電気泳動に関する報告は赤血球やリンパ球に比して少ない。Table 7 は coronary heart disease 患者血小板の電気泳動度を検討した Karpinnen の成績である。¹⁸⁾ cardiovascular disease において血小板の電気泳動度が正常者と比べて変化しているかどうかという問題は、赤血球同様、長い間論議されてきている。かつて coronary heart disease では正常者に比して血小板の電気泳動度は高いといわれていたが、Gröttum¹⁶⁾ は cardiovascular disease と正常者を比較して有意の差はなかったといっている。Table 7 に示すように $1/15M$ phosphate buffer で泳動して粘度補正して泳動度を計算すると、正常者では $1.207 \pm 0.031 \mu/\text{sec}/V/\text{cm}$, coronary

Table 7. Viscosity-corrected mobilities of platelets in the CHD and the control series.¹⁸⁾

		< 45 years	45—54 years	≥ 55 years	Total
Coronary heart disease	Mean $\pm$ S. D.	1.199 ± 0.044	1.201 ± 0.050	1.192 ± 0.052	1.197 ± 0.048
	N	13	21	19	53
	Range	1.132—1.253	1.124—1.319	1.118—1.285	1.118—1.319
Control subjects	Mean $\pm$ S. D.	1.211 ± 0.030	1.198 ± 0.024	1.215 ± 0.042	1.207 ± 0.031
	N	19	18	11	48
	Range	1.164—1.249	1.137—1.251	1.149—1.293	1.137—1.293
	P	<0.30	<0.90	<0.20	<0.20

heart disease では $1.197 \pm 0.048 \mu\text{sec/V/cm}$ で両者の間に有意の差はみられていない。さらに血小板の aggregating agent である adenosine diphosphate ADP に対する虚血性心疾患患者血小板の感受性を検討した Hampton らの実験を紹介する。¹⁷⁾ Fig. 16 上に示すように、正常者血小板は ADP 濃度 $0.05 \mu\text{g}$ で泳動度増加が最大となるが、本疾患血小板では $0.005 \mu\text{g}$ で最高となる。すなわち、虚血性心疾患患者血小板は ADP に対して感受性が高いことを意味している。Fig. 16 下は本症の血小板の ADP, noradrenalin の影響を比較したものであるが、noradrenalin ではとくに影響は認められていない。このような ADP に対する感受性の亢進が、虚血性心疾患の発症にどのような役割を通じているのか論議のあるところであるが、一方、この見解に反対する学者も

Changes induced by A.D.P. in 20 patients with ischaemic heart-disease and in 20 matched controls.

Mean platelet electrophoretic mobility changes induced by A.D.P. and noradrenaline in 20 patients with ischaemic heart-disease.

Fig. 16. Abnormal platelet behaviour in vascular disease.¹⁷⁾

いて、未だ意見の一致をみていない。同様のことは経口避妊薬投与婦人血小板でも検討されている。¹⁸⁾ すなわち妊娠婦人血小板の ADP, noradrenalin に対する影響を電気泳動的に検討した成績によると、妊婦血小板は正常血小板と差はないが、経口避妊薬を服用すると、3週目で血小板の泳動度は ADP 処置により著しく高くなる。休業すると正常のパターンに復するところから、経口避妊薬投与が血栓症発症の1つの因子ではないかと推論している。

3. リンパ球の細胞電気泳動的变化

各種疾患時における末梢血リンパ球の電気泳動的变化に関する研究はよく行われている。とくにリンパ増殖性疾患における Sabolović らの仕事はよく知られている。¹⁹⁾ Fig. 17 に示すようにほとんどすべての小児の ALL と多くの CLL は $1.05 \mu\text{sec/V/cm}$ の泳動度をもつ分画から成り、一部の CLL は $0.81 \mu\text{sec/V/cm}$ にピークを有する分画から成る。前者は T 細胞、後者は B 細胞であることが確められ、また頻度は多くないが、 $0.68 \mu\text{sec/V/cm}$ の泳動度を有する成人型 B-ALL, $1.19 \mu\text{sec/V/cm}$ の泳動度を有する成人型 T-CLL も認められたとのべている。こうしたことから Sabolović らはリンパ性白血病を T 細胞型、B 細胞型に分けることが、電気泳動的にも可能であると報告している。また Sezary 症候群についての検討では Fig. 18 に示すように、²⁰⁾ 形態学的に小さな Sezary 細胞を有した症例では平均電気泳動度の上昇がみられ、同時に早い泳動度を示す分画の比率が増加している。一方、大型の Sezary 細胞をもつ症

Fig. 17. リンパ性白血病におけるリンパ球の細胞電気泳動図。¹⁹⁾

白いヒストグラムは正常リンパ球

Fig. 18. Histogram of electrophoretic mobilities of lymphocyte populations found with Sézary syndrome.²⁰⁾

例では平均電気泳動度が低下し、早い分画の比率の低下がみられている。Sezary 細胞はふつう T 細胞の性格をもつといわれているが、電気泳動的には種々の態度をもつようである。

免疫不全症候群患者リンパ球の細胞電気泳動については Durandy らの報告がある²¹⁾ (Fig. 19)。A は正常であり、B の Bruton 型無 γ -グロブリン血症では B 細胞分画が消失している。C は variable immunodeficiency, D は severe combined immunodeficiency で、遅い分画はリンパ球全 population の 86% におよび早い T 細胞がほとんど消失していることがわかる。

癌患者末梢血リンパ球についても幾つかの報告がみられるが、ここではまず Plagne らの成績を紹介する。²²⁾ Fig. 20 は正常末梢血リンパ球の早い泳動度を示す分画、すなわち $1.16 \mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$ の泳動度を有する分画について比較したものである。全身に転移を認めた癌患者ではこの分画の泳動度が低下している。この点に関して、Sabolović らはさらに肺癌で詳細に検討し、T 細胞は電気泳動度の低下が著しく、同時に B 細胞は電気泳動度の変化はなくて数が減少しているとのべている。²³⁾ 肺癌手術成功例の 2 ケ月後をしらべてみると、この T 細胞の電

気泳動度低下の回復と、B 細胞数の増加がみられたとのべ、癌患者における T 細胞電気泳動度の変化は経過観察上、1 つの指標になるといっている。

慢性関節リウマチ (RA) 患者リンパ球の電気泳動は Brown らが報告している。²⁴⁾ 彼らは正常リンパ球を電気泳動した際、早い分画と遅い分画の間にもう 1 つの intermediate population の存在を主張し、RA ではこの intermediate population が 23% と増加し、同時に関節滑液リンパ球でも 34% に増加するとのべている。しかも RA の臨床的重症度とこの intermediate population とは相関するといわれ、intermediate population の比率は RA が重症になるにつれ増加することが認められたとのべている。intermediate population の増加が RA に特異的であるかどうかという問題について、彼らは血液、関節滑液で検討した。Table 8 に示すように他の膠原病や類縁疾患では増加せず、RA に特異的であるから、この intermediate population の増加を認めることで、診断的価値が高いことを報告している。今後この分画の存在とその意義について検討する必要があると思われる。

以上、細胞電気泳動法を用いた血液細胞の臨床的動態

Fig. 19. Electrophoretic mobility histograms of human blood lymphocytes in immunodeficiencies.²¹⁾

A : Normal lymphocytes, B : X-linked agammaglobulinemia, C : Variable hypogammaglobulinemia, D : Severe combined immunodeficiency.

Fig. 20. 癌患者末梢血リンパ球の細胞電気泳動的変化.²²⁾

In the control group, a mean speed of $1.16 \pm 0.02 \mu\text{m. sec}^{-1} \text{v}^{-1} \text{cm}$ represent 79.8 ± 5.5 percent of the total lymphocytes.

Table 8. A comparison of the mean percentage distribution of intermediate mobility lymphocytes in (a) blood, and (b) synovial fluid of patients with connective tissue disorders.²⁴⁾

(a)		
	Number of patients	Mean % intermediate lymphs
Sero-positive rheumatoid arthritis	60	23
Sero-negative polyarthritis	7	8
Ankylosing spondylitis	9	7
Psoriatic arthropathy	13	5
SLE	9	9
Osteoarthritis	17	7
Normals	30	9
(b)		
	Numbes of patients	Mean % intermediate lymphs
Sero-positive rheumatoid arthritis	60	34
Sero-negative polyarthritis	15	19
Ankylosing spondylitis	6	13
Psoriatic arthropathy	6	16
Osteoarthritis	10	9

についてこれまでの報告を概観した。赤血球や血小板など、ある疾患では明らかに一定の傾向を示すものもある。リンパ球においても同様で、リンパ性白血病や免疫不全症のようにT細胞、B細胞の変動が明らかな場合は、細胞電気泳動の所見もそれに伴った変化が得られる。しかし今後、検討されねばならない点が少ないことは事実である。

細胞電気泳動法の臨床応用としてもう1つ注目すべきものに細胞電気泳動試験がある。

細胞電気泳動試験

Electrophoretic mobility test (EMT)

1. マクロファージ細胞電気泳動法

Macrophage electrophoretic mobility test (MEM-test)

細胞電気泳動試験は1970年 Field and Caspary によってマクロファージ細胞電気泳動法としてはじめて報告された。²⁵⁾ その後多くの人たちの追試により方法も改良され²⁶⁾臨床にも応用されてきた。その原理は Fig. 21 に示す如くである。感作リンパ球を特異抗原とともに *in vitro* で培養すると、種々の生物学的活性を有する因子が遊離される。この因子はマクロファージの電気泳動を

遅延させることから、macrophage slowing factor と呼び、lymphokines の一種と考えられている。マクロファージはモルモット腹腔内に流パラを投与して得られるが、自己のリンパ球との interaction を防ぐため 200 rad の放射線照射を行ったものを用いる。方法の詳細については本学会で幾度も報告したので、²⁷⁾ ここでは省略する。

Fig. 22 は遅延型過敏反応の代表である精製ツベルクリン (PPD) を用いてマクロファージ細胞電気泳動法を行った成績である。ツベルクリン反応陽性者リンパ球では PPD 添加によって泳動遅延がみられ、ツ反応陰性者リンパ球では遅延率の低いことが認められた。このマクロファージ細胞電気泳動法は癌や多発性硬化症で陽性率が高いといわれ、その場合抗原として encephalitogenic factor (myelin basic protein) や cancer basic protein が用いられている。Fig. 23 は各種疾患について行った諸家の成績である。²⁸⁾ 事実、悪性腫瘍では陽性率が高いが、心筋梗塞やリウマチ性疾患でも false positive を示すことが多い。こうしたことの起る原因の1つとしてマクロファージの多様性による電気泳動的不均一性が指摘

Fig. 21. Principle features of the MEM Test.

(Pritchard, J. A. V. : in Cell Electrophoresis, ed. by Preece and Sabolovic, North Holland p. 337, 1979)

Fig. 22. MEM test of PPD-positive and -negative subjects.

Fig. 23. Ranges of macrophage slowing in various disease states with myelin basic protein in MEM test.²⁸⁾

されている。この点を Shenton らは精細に検討した。²⁹⁾ モルモット腹腔内より採取したマクロファージを、大きさ、パラフィン油滴存在の有無によって7つのタイプに分類し、各タイプの電気泳動度を測定した。このうちタイプ4は直径 16μ 、パラフィンを2〜3滴貪食したマクロファージであるが、このタイプのマクロファージを indicator cell として PPD 刺激リンパ球上清による細胞電気泳動を行うと著しい遅延率が得られたという。このことから Shenton らはマクロファージ電気泳動法ではマクロファージの選択を十分吟味するべきであるとのべ、この選択を誤ると結果にばらつきが生じると警告している。このようなマクロファージ使用のわづらわしさを解決したのがタンニン酸羊赤血球である。

2. タンニン酸羊赤血球電気泳動法

Tannic acid erythrocytes electrophoretic mobility test (TEEM-test)

受身血球凝集反応に用いるタンニン酸処理羊赤血球をそのまま細胞電気泳動試験の indicator cell として使用するのである。³⁰⁾ タンニン酸処理羊赤血球は電気泳動的に極めて均一であり、電流方向を変えて左右別方向に泳動したとき、その泳動時間には差のないことが認められた (Fig. 24)。また Hannig の triethanolamine buffer

Fig. 24. Cytopherogram of tanned SRBC by polar change.

中で羊血球は沈降速度が遅く浮遊したままの状態を長く維持しているので測定も容易であるという利点もある。タンニン酸羊赤血球は Stavitsky の法³¹⁾に従って自分で作製することも容易であるが、最近細胞電気泳動試験研究者の需要に答えて、Bohringwerke より EIC (EMT indicator cells) あるいは ETS (tanned and sulphosalicylic acid-stabilized sheep erythrocytes) として市販された。ETS はタンニン酸処理後さらにスルフォサリチル酸で安定化し、長期使用を可能にしたものである。我々も ETS 使用の機会を得たので、その電気泳動度を測定した。Table 9 に示す如く、新鮮羊血球、自家製と全く変らなかった。因みにこの ETS と PHA、あるいは Con A を 37°C 、45分加えた場合にも泳動度は変化しなかった。この方法により反応陽性者リンパ球の PPD に対する反応性を調べてみると、Fig. 25 に示すようにツ反応陽性者では平均 20.64% の遅延率を認めたが、ツ反応陰性者では遅延がみられなかった。この場合先のマクロファージ電気泳動試験より結果にばらつきの少ないことが確認された。

本法の癌診断への応用も近年活発に行われている。本法の陽性と臨床診断の間には良好な相関関係のあることは多くの研究者が認めている。³²⁻³⁵⁾ Fig. 26 はそのまとめたものの一部である。³⁴⁾ 各種の癌で高い陽性率が報告されている。これらの成績の多くは抗原として encephalitogenic factor, cancer basic protein を用いているが、抗原の選択はやはり重要な問題であろう。我々は RA, SLE 患者リンパ球にそれぞれヒト IgG, DNA を加えて incubate し、その培養上清で本法を行った。Fig. 27 に示すようにいずれも対照に比して泳動遅延の傾向が認められた。まだ症例数も少なく、疾患の活動性や治療の影響などを選定していない成績であり、今後の検

Table 9. Mean electrophoretic mobilities of sheep erythrocytes.

Cells	Mobilities ($\mu/\text{sec}/\text{V}/\text{cm}$)
Fresh sheep erythrocytes	-1.54 ± 0.14 (100)**
Tanned sheep erythrocytes	-1.55 ± 0.10 (300)
ETS*	-1.57 ± 0.12 (510)
ETS+PHA	-1.58 ± 0.14 (100)
ETS+Con A	-1.57 ± 0.18 (100)

* Tannic acid treated sulphosalicylic acid stabilized sheep erythrocytes (supplied by Behringwerke).

** Counted cells number.

Fig. 25. % reduction of TEEM in PPD positive and negative subjects.

Fig. 26. Immunodiagnosics of malignant disease.³²⁾

Results of the electrophoretic mobility test (EMT) in different malignant, non-malignant diseases and control values. In this test series the encephalitogenic factor (EF) was used as antigen. There is a significant ($p < 0.001$) difference between benign and malignant diseases since 91% of the malignant diseases are reactive to the EF and cause an inhibition of the ETS of more than 5.0%.

Fig. 27. SLE, RA の細胞電気泳動試験.

Fig. 28. % slowing of TEEM in normal lymphocytes stimulated with PHA and Con A.

討が必要であると思う。

一方、非特異的 mitogen である PHA や Con A でリンパ球を刺激し、その培養上清でタンニン酸羊血球電気泳動を行った結果が Fig. 28 である。PHA リンパ球の1時間の反応による培養上清で羊血球は19.0%の泳動遅延を示した。³⁶⁾しかし Con A では1時間でも48時間でも遅延率は PHA ほど大きくなかった。

マクロファージ電気泳動試験にせよ、タンニン酸羊血球電気泳動試験にせよ、遅延を惹き起す因子は何かとい

う問題は興味のあるところである。現在, electrophoretic slowing factor といわれ, lymphokines の1つであるとされているが詳細は不明である。Shenton らはマクロファージ泳動遅延因子も, タンニン酸羊血球泳動遅延因子もほぼ同じ物理化学的性質をもった分子量13,000~15,000の物質であると報告している。³⁰⁾

いずれにせよ細胞電気泳動試験の臨床的応用は今後ますます発展する可能性があり, 病気の診断, 活動性の判定に利用されるものと思われる。本法による癌診断への応用は, 1979年10月ミュンヘンで開かれた細胞電気泳動に関するシンポジウム³⁷⁾でも1つのトピックとしてとりあげられ, Field, Shenton, Jenssen, Ax, Tautz, Lampert らによる熱のこもった討論がなされたことは記憶に新しいところである。欧米に比して我が国では細胞電気泳動試験に対する関心は未だ低いが, 今後の発展を期待したい。

おわりに

細胞電気泳動法の臨床的応用と題して, 現在用いられている細胞電気泳動装置の概説と臨床医学領域への応用について今日までに知られている知見を簡単にのべた。細胞電気泳動法の歴史は古いにもかかわらず, その普及, 発展にはもう一步というものが感じられる。この方法が血漿蛋白質の電気泳動法と同様に, 臨床検査室で利用される日のくることを念じて, 今後も努力したいと思っている。

本講演の機会を与えて下さいました本学会々長・平井秀松教授, 大会々長・井上 勲教授に深く感謝致します。また, Laser Zee 500, Laser Zee 3000, Density gradient electrophoresis 使用の機会を与えて下さいましたセントラル科学貿易・村田正雄氏, ETS を分与下さいましたヘキストジャパン・益田氏に御礼申し上げます。さらに細胞電気泳動の実験について, 終始協力して下さいる協同研究者, 東京慈恵医大第3内科免疫研究室・揚塩正樹, 能勢俊一, 堀田正一諸学士に厚く感謝します。

文 献

- 1) Pretlow, T.G. and Pretlow, T.P. : Intern. Rev. Cytology, **61** : 85, 1979, より引用.
- 2) 橋本信也 : 臨床病理, 臨時増刊特集, **30** : 125, 1977.
- 3) 橋本信也他 : 生物物理化学, **18** : 241, 1974.
- 4) 橋本信也 : 生物物理化学, **23** : 209, 1979.
- 5) Ruhenstroth-Bauer : Cell Electrophoresis (ed. by Ambrose, E.J.) J and A Churchill Ltd, London, 1965, p. 66.

- 6) Häyry, P. and Anderson, L.C. : Scand. J. Immunol., **5** (suppl. 5) : 31, 1976.
- 7) 橋本信也 : 医学のあゆみ, **112** : 102, 1980.
- 8) Catsimpooulas, N. and Griffith, A.L. : Methods of Cell Separation vol. 1 (ed. by Catsimpooulas, N.) Plenum Press, New York, 1979, p. 1.
- 9) Platsoucas, C.D. and Catsimpooulas, N. : J. Immunol. Methods, **26** : 245, 1979.
- 10) Platsoucas, C.D. et al. : Proc. Nat. Acad. Sci., **76** : 1972, 1979.
- 11) Begg, T.B. et al. : J. Ather. Res., **6** : 303, 1966.
- 12) Davis, D.F. : Amer. Heart J., **70** : 720, 1965.
- 13) Karppinen, K. : Acta med. Scand., Suppl., **506** : 7, 1970.
- 14) Rottino, A. and Angers, J. : Cancer Res., **21** : 1445, 1961.
- 15) Hause, L.L. et al. : Scand. J. Haematol., **20** : 141, 1978.
- 16) Grøttum, K.A. : Lancet, **i** : 1406, 1968.
- 17) Hampton, J.R. and Mitchell, J.R.A. : Lancet, **ii** : 764, 1966.
- 18) Bolton, C.H. et al. : Lancet, **i** : 1336, 1968.
- 19) Sabolović, D. : Cytobios, **12** : 79, 1975.
- 20) Stoltz, J.F. et al. : Biomedicine, **31** : 14, 1979.
- 21) Durandy, A. et al. : Clin. Imm. Immunopath., **4** : 440, 1975.
- 22) Plagne, R. et al. : Biomedicine, **23** : 447, 1975.
- 23) Amiel, J.L. and Sabolović, D. : Cell Electrophoresis, Clinical Application and Methodology (ed. by Preece, A.W. and Sabolović, D.) North Holland Publish., Amsterdam, 1979, p. 119.
- 24) Brown, K.A. et al. : ibid. p. 55.
- 25) Field, E.J. and Caspary, E.A. : Lancet, **ii** : 1337, 1970.
- 26) Pritchard, J.A.V. et al. : Brit. J. Cancer, **28** (suppl. 1) : 229, 1973.
- 27) 橋本信也他 : 生物物理化学, **21** : 96, 1977, **21** : 314, 1977, **22** : 45, 1978.
- 28) Bagshawe, K.D. : Antibiotics Chemother, **22** : 155, 1978.
- 29) Shenton, B.K. et al. : Brit. J. Cancer, **28** (suppl. 1) : 215, 1973.
- 30) Shenton, B.K. et al. : J. Immunol. Methods, **14** : 123, 1977.
- 31) Stavitsky, A.B. : J. Immunol., **72** : 360, 1954.
- 32) Porzolt, F. : Z. Immun. Forsch., **155** : 183, 1978.
- 33) Ax, W. : Immunodiagnosis and Immunotherapy of Malignant Tumors (ed. by Flad, H.D. et al.) Springer Verlag, New York, 1979, p. 169.

(226) 生物物理化学

- 34) Douwes, F. R. et al. : Oncology, **35** : 163, 1978.
- 35) Lampert, F. et al. : Brit. J. Cancer, **35** : 884, 1977.
- 36) 橋本信也他 : 医学のあゆみ, **110** : 408, 1979.
- 37) International Conference : Electrokinetic

Properties and Functions of Bioparticles
Topic 4. Analytical Cell Electrophoresis
Theoretical Background and Clinical Application, Oct. 17-20, 1979, Max Planck Inst., Munich.