薄層 PAG 等電点分画法による血液 (ヘモグロビン) の種属鑑別*

大島美奈子・井上徳治・原 三郎**

Summary

A method for the discrimination of human hemoglobin from animal hemoglobins is described. Hemoglobins of 36 species (human, human fetus, 21 nonhuman primates and 13 non-primate vertebrates) were examined by isoelectric focusing (IEF) in thin layer polyacrylamide gel plates containing an Ampholine gradient of pH 3.5-9.5. From the viewpoint of discrimination of human hemoglobin from animal hemoglobins, hemoglobin samples treated with *p*-chloromercuribenzoate were more effective in IEF than those of untreated. Estimates of the isoelectric points of the major and minor hemoglobins of each species were also described.

Key words: human hemoglobin, animal hemoglobin, isoelectric focusing, *p*-chloromercuribenzoate, isoelectric points.

ヒトの血液と動物の血液との鑑別検査には、法医学領域では抗ヒト・ヘモグロビン (Hb) 免疫血清 (動物 Hb 吸収) による沈降反応が汎用されている。しかし、この方法では、ヒトと、ヒトに近縁な猿類との鑑別はかなり困難であり、また、動物の種属の判別にも適さない。

そこで、抗血清を用いない鑑別検査法を確立したいと考え、猿類21種をはじめ、13種の一般動物の Hb について薄層 PAG 等電点分画 (IEF) 法を試みたところ、みるべき成績を得た。

なお、IEF で個体差がみられた2種の猿類 Hb については、カラムクロマト法を併せ試みたので、その成績も報告する。

実験材料および方法

1. 試料の調製: ヒト, ヒト胎児のほか, ウシ, ウマ, ブタ, ヒツジ, イヌ, ネコ, ウサギ, ラット, マウス (以上各2), ニワトリ1, ハト1例と, 猿類のうち真猿類 (Simiae) 17種—チンパンジー, マントヒヒ, アカゲザル, ニホンザル, タイワンザル, シロテテナガザル, ミドリザル (以上各2), チュウベイクモザル1, コモ

ンリスザル3, ヨザル1, キャプチンザル1, カニクイザル7, ベニガオザル2, ブタオザル3, パタスザル2, パンジェン3, シルバーマーモセット3例と原猿類 (Prosimiae) 4種—ワオキツネザル2, オオガラゴ2, スローロリス2, コモンツパイ1例の合計34種の血液についてトルエン法によって調製した溶血液と魚類2種—コイ, タイ各1例の全血を試料とした。各試料は、いずれも水または10 mM NaCl 加 pH 6.0, 10 mM リン酸緩衝液にて希釈し、その Hb 濃度を約0.1%に調製した。

2. 微量 Hb に対する *p*-chloromercuribenzoate (PCMB) 反応: 前記緩衝液にて調製した各試料0.5 ml について、0.1% PCMB 溶液0.025 ml を加え、5℃, 16-20 h 反応させ、反応液を IEF 試料とした。

3. 薄層 PAG IEF: 各試料について、Ampholine PAG plate (LKB, pH 3.5-9.5, gel conc. 5%, Ampholine conc. 2.4%) を用い、常法どおりの条件で分画後、*o*-dianisidine にてヘム蛋白染色を行い、判定した。なお、次項4) の pH marker は coomassie brilliant blue R-250 にて染色した。

4. pI 値の測定: 表面電極 (LKB) と、pH marker

* Identification of species of blood (hemoglobin) by isoelectric focusing in thin layer polyacrylamide gel.

** Minako Oshima, Tokuji Inoue, Mitsuwo Hara, 久留米大学医学部法医学教室。
(受付 1981年8月15日; 受理 1982年1月25日)

(72) 生物物理化学

7 種 (cytochrome c, Mb (whale), Mb (Horse), conalbumin, β -lactoglobulin A, albumin (bovine, Cohn fr. V), ovalbumin²⁾) を用いて得られるゲル表面の pH 曲線から, 各種属 Hb の pI 値を求めた (測定温度 25°C). なお pI 値は同一試料について 3~5 回計測し, 平均値をとった.

5. Column chromatography: カニクイザル Hb 7 例およびブタオザル Hb 3 例について, CM-52 (Whatman) cellulose カラム (2.5×15 cm) による chromatography を, pH 6.8, 10 mM リン酸緩衝液と 20 mM Na₂HPO₄ 溶液各 500 ml との linear grad. 溶出³⁾ (30 ml/h) にて行った. また, カニクイザル 全例の経時 Hb (5°C, 5 カ月) について, Sephadex G-100 ゲル透過を Barnicot ら⁴⁾ の方法を改変して, 1.6×95 cm カラム 上 100 mM NaCl 加 pH 6.8, 50 mM リン酸緩衝液溶出 (18 ml/h) にて試みた. 上記 2 法は, いずれもヒト Hb を対照として行い, 540 nm 吸収を測定した.

実験成績

1. 溶血液 (Hb) の IEF: 各種属 Hb の IEF の成績

は Fig. 1 のとおりで, いずれも 3~6 本のバンドに分れた. 各 Hb の pI 測定値を major, minor バンドに分けて, Table 1 に示す. なお, 複数例を検した種属のうち, カニクイザルとブタオザルでは分画像に個体差が認められた.

猿類 Hb では, 21 種中 15 種で分画像がヒト Hb のそれに類似したが (後述するように “霊長類型” と称する), ヒトと 1 次構造が同一の チンパンジー⁵⁾ を除き, pI 値の違いからヒトとの識別は可能であった. 他の 6 種の猿類 (カニクイザル, ベニガオザル, ブタオザル, キツネザル, ガラゴ, ツバイ) ならびにヒト胎児, 一般動物 13 種の分画像はヒト成人のそれと異なり, 差異は明瞭であった.

2. PCMB 処理 Hb の IEF: Fig. 2 に示すように, 真猿類 17 種の PCMB 処理分画像は, いずれもヒトと同様に α , β 鎖に解離したパターン³⁾ を示した (第 1 群). 各鎖の pI 値はチンパンジーを除き, それぞれヒトと異なり, ヒト Hb との判別は容易であった. なお, 前記 1) の分画像において個体差がみられたカニクイザル, ブタオザルでは, Fig. 2 のように PCMB 処理の分画像

Fig. 1. IEF patterns of hemoglobins.

1. human, 2. human fetal, 3. bovine, 4. horse, 5. pig, 6. sheep, 7. dog, 8. cat, 9. rabbit, 10. rat, 11. mouse, 12. chicken, 13. pigeon, 14. chimpanzee, 15. H. baboon, 16. rhesus M, 17. japanese M, 18. formosan M, 19. W.H. gibbon, 20. green M, 21. spider M, 22. squirrel M, 23. night M, 24. capuchin M, 25. crab-e. M, 26. stump-t. M, 27. pig-t. M, 28. patas M, 29. pinché, 30. S. marmoset, 31. ring-t. lemur, 32. G. galago, 33. S. loris, 34. C. tupaia, 35. carp, 36. porgy.

Fig. 2. IEF patterns of PCMB-treated hemoglobins.
Numbers and name of species are the same as in Fig. 1.
P=PCMB-treated.

Fig. 3. a : Elution profile produced by CM-cellulose chromatography of the hemoglobins from 7 crab-eating monkeys (1~4) and human.
b : Elution profile produced by CM-cellulose chromatography (1, 2) and IEF patterns of the hemoglobins from 3 pig-tailed monkeys.

Table 1. Isoelectric points of hemoglobins.

	major	minor		
Human	6.95	7.23	7.11	7.08
Human fetus	7.03	7.37	7.21	
Chimpanzee	6.95	7.23	7.11	7.08
W. H. Gibbon	6.98	7.27	7.16	7.10
H. Baboon	7.06	7.29	7.21	7.18
Japanese M	7.00	7.25	7.13	7.10
Stump-tailed M	6.79, 6.98	7.08	6.93	
Pig-tailed M	6.72	6.75	6.92	6.87
Pig-tailed M	6.75	6.72	6.92	6.87
Formosan M	7.01	7.28	7.16	7.13
Rhesus M	6.99	7.28	7.15	7.12
Crab-eating M	6.77, 6.97	7.11	7.08	
Crab-eating M	6.96	7.10	7.07	
Patas M	6.97	7.10	7.08	
Green M	6.99	7.27	7.14	7.11
C. A. Spider M	6.94	7.24	7.13	7.09
C. Squirrel M	6.89	7.21	7.09	7.04
Capuchin M	6.94	7.23	7.11	7.06
Night M	6.97	7.24	7.14	7.09
Pinché	6.96	7.11	7.08	
S. Marmoset	6.98	7.13	7.07	
G. Galago	7.12	6.97	6.92	6.76
S. Loris	7.15	7.31	7.26	
Ring-t Lemur	6.90, 7.10	7.05	6.78	
C. Tupaia	7.22	7.33		
Bovine	6.95	7.25	7.12	
Horse	6.72	6.93	6.91	6.67
Pig	6.81	7.02	6.62	
Sheep	6.85	7.23	7.05	
Dog	6.89	7.26	7.10	7.06
Cat	7.05	7.25	7.21	6.89
Rabbit	7.18	7.33	7.25	
Rat	7.11	7.20	6.87	
Mouse	7.04	7.24	7.15	
Chicken	7.79	7.65		
Pigeon	7.70	7.85	7.54	
Carp	6.05	5.90	6.40	5.70

(at 25°C)

にても個体差がみられ、 α 鎖分画域に差異を認めた。

次に、原猿類4種、一般動物11種およびヒト胎児ではPCMB処理によっても分画域がほとんど変わらないものの9種(第2群)、pIシフトが認められたもの7種(第3群)であったが、これらはいずれもヒトの分画像とは明らかに異なった。上記第1~3群の各種属名は、Table 2aに列記した。なお、魚類血のPCMB処理像は不鮮明であったので、分類からは除外したが、明らかにヒトとは異なるパターンを示した。

3. Column chromatography: カニクイザル Hb 7

例では、CM-cellulose chromatography によって Fig. 3a のように4つの異なる溶出パターンが得られたが、Fig. 3a (2)~(4)の各ピークの溶出位置から、電気的に異なる性質の major Hb が少なくとも3種存在すると考えられた。

他方、5°C、5カ月経過 Hb の G-100 ゲル濾過では、各例ともヒト Hb と同位置に単一ピークとして溶出された。したがって、これら7例には、日数の経過とともに polymer に移行し易い性質をもつとされている variant P⁴¹ を含んでいないと考えられた。

以上の成績ならびに前記1)の分画像を、Barnicot らのデンブングル泳動による成績と対比すると、カニクイザルの major Hb Q, A⁴¹ は、IEF の pI 6.77, pI 6.96 のバンドではないかと推定された。

次に、ブタオザル Hb 3例についての CM-cellulose chromatography の結果を Fig. 3b に示し、また、その分画像を同図内に付記した。ブタオザルの個体差は、pI が異なる Hb 2個 (pI 6.72, 6.75) の組成比の違いによる⁶⁾ ことが、この chromatography の成績から確認された。これらの pI 6.72, 6.75 のバンドは、それぞれ、major Hb A^I, A^{II} (Nute ら⁷⁾) に相当すると推定された。

考 案

薄層 PAG IEF 法による微量の血液(Hb)または血痕の種属鑑別については、すでにその一部を報告した^{3,8)}。今回は、猿類を中心に計36種属の①未処理Hb、②PCMB処理Hbを、それぞれ試料として、ヒトと動物、とくに猿類との異同に重点をおいて検討を行った。また、動物HbのpI値の報告は、わずかに数種の動物^{9,10)}に限られているので、前記各種属のHbのpI値についても測定を試みた。

1. ヒトとの鑑別: 実験結果を Table 2b にまとめた。ヒト胎児および一般動物の場合は、①未処理Hb、②PCMB処理Hbのいずれの分画像とも、ヒト成人のそれとは異なり、ヒト成人との鑑別は容易であった。他方、猿類の場合には、①、②のそれぞれにおいて、ヒトと分画パターンが類似するもの(次項、霊長類型)と、そうでないもの(①では Table 2b 中の6種、②では原猿類)とに分れた。しかし、霊長類型を示す種属も、1次構造がヒトと同一のチンパンジーを除き、ヒトとの識別は可能で、とくに PCMB 処理 Hb では容易であった。

以上のように、原猿類以下の動物では、PCMBによる解離パターンがみられなかったが、このことは、人・獣

Table 2.

a : Classification of IEF patterns of PCMB-treated hemoglobins.

*=Amino acid sequences are decided.

1) α , β Chains Dissoc. Pattern			
Human*	Crab-e. M*		
Chimpanzee*	Patas M*		
Gibbon*	Green M*		
H. Baboon	Spider M*	$\alpha 1$ (104 Cys)	
Japanese M*	Squirrel M*	$\beta 2$ (93, 112 Cys)	
Stump-t. M	Capuchin M*		
Pig-t. M*	Night M*		
Formosan M	Pinché*		
Rhesus M*	S. Marmoset		
2) No pI Shift			
G. Galago			
S. Loris*	$\alpha 2$ (104, 111)	$\beta 1$ (93)	
Ring-t. Lemur			
Mouse*	1 (104)	1 (93)	
Rabbit*	1 (104)	1 (93)	
Bovine*	0	1 (93)	
Horse*	1 (104)	1 (93)	
Pig*	1 (104)	1 (93)	
Human Fetal*	1 (104)	1 (93)	
3) pI Shift			
C. Tupaia*	$\alpha 2$ (104, 111)	$\beta 2$ (93, 116)	
Sheep*	1 (111)	1 (93)	
Dog*	2 (104, 111)	2 (93, 112)	
Cat			
Rat*	3 (14, 104, 111)		
Chicken*	2 (104, 130)	3 (23, 93, 126)	
Pigeon			
b : Identification of species of hemoglobin (blood) by use of IEF in PAG.			
1) Hb : *Primate Hb type			
Primates	<div><div>I</div><div>II</div><div>5</div><div>4</div><div>3</div><div>2</div><div>1</div></div>		
*Others	Primates (Stump-t. M, Pig-t. M, Crab-e. M. Galago, Lemur, Tupaia, Orangutan)		
	Others		
2) PCMB-treated Hb :			
*Primate Hb type			
(α and β Chains Dissoc. type)			
Primates (Simiae)			
*Others			
Primates (Prosimiae)			
Others			

血鑑別上の1つの目安になる点ではないかと思われる。

2. 霊長類型について：ヒトと多くの猿類では、①未処理 Hb, ② PCMB 処理 Hb のそれぞれにおいて、共通にみられるパターン、すなわち“霊長類型”とでも称すべき分画像が認められた。

まず、①未処理 Hb の場合は、major 1 個をもち、Table 2 b 枠内のような分画像を特徴とする。〔1—minor 成分、ヒトの場合の A₁。2—major バンド。3 (I, II)—部分酸化 Hb (ヒト¹¹⁾。4—Met Hb で、新鮮なものではほとんど認められない。⁸⁾ 5—A₂ で、これが認められる種属は限定されている。¹²⁾〕

ちなみに、この霊長類型を示す猿類15種の2～4のpI差をTable 1から求めると、0.23～0.32内にあり、ヒト0.28に近接する(±0.05)。これは、これら15種の猿類Hbの1次構造がヒトに近似する^{5,13)}ため、酸化によるconformationの変化、ひいてはpIシフト値もヒトに似た傾向を示すことによると考えられる。他方、これら15種の2-3_I, 2-3_{II}のpI差0.09～0.15, 0.13～0.20もまたヒトのそれ(0.13, 0.16)に近い値を示した(各±0.04)。これらのpIシフトも前述と同じ理由によると考えられるので、3の2本のバンドは、猿類の場合も、ヒトと同じく部分酸化Hbではないかと推定された。

霊長類型以外の群に分類した猿類では、ツバイを除いて、major Hbの多形が認められた。なお、Table 2 b中のオランウータンは今回分画を行っていないがmajor Hb 2個を有する¹⁴⁾ので、霊長類型以外の群に入ると考えられる。

次に、②のPCMB処理Hbの場合における霊長類型とは、前述のように、ヒトの α 鎖(陰極側)、 β 鎖(陽極側)解離パターン⁸⁾に類似するものを指し、真猿類(Table 2 a, 第1群)がこれに相当した。

ところで、PCMBはSH基(Cys)と反応する¹⁵⁾ので、第1群のうち、1次構造が明らかなもの^{5,13,16-18)}(*印)についてCysを求めると、ヒトと同じく α 鎖は104位に1個のCysを、また、 β 鎖は93位と112位とにそれぞれCysを有している。このことは、monomer生成には β 鎖に2個のCysが必要であるというRosemeyerら¹⁵⁾の報告と矛盾せず、したがって、前述の“霊長類型”の解離パターンを示すこともよく理解できる。

なお、霊長類型以外の群は、これをさらに、Table 2 aの第2群(No pI shift)と第3群(pI shift)に分けることができる。第1群と同様に1次構造が明らかなもの^{5,19)}について調べてみると、第2群は β 鎖112位のCysがほかのアミノ酸におき換わり、 β 鎖のCysは1個である。このため、monomerは生ぜず、たとえdimer生

成^{15,20)}があったとしても、その pI 変動は小さいと推定される。

また、第3群では、 α 鎖104位、 β 鎖93位以外にも Cys をもつが、pI シフトはこれらのうち、分子外表の Cys と PCMB との結合^{21,22)}による可能性が考えられる。ただし、第3群中のイヌは、 β 鎖に Cys 2個をもち、PCMB によって両鎖に分離するとされている¹⁵⁾が、今回は、ヒトと類似の陰陽両極への解離パターンか否かという観点から、上記の分類を行ったので、ここでは第3群に入れることにした。

3. 二、三種属における Hb の個体差：Hb の個体差 (phenotypic variability—この場合、異常 Hb は除く) については、デンブング泳動法を用いて、出現頻度の高いいくつかの種属(主に猿類)が報告されている。^{4,6,23)} そのうち、カニクイザルでは、ヒト major A₀ に近い pI の major A と、その変異 Q, P (ともに α 鎖変異。Pは出現頻度が低く、日数の経過とともに保存血中で polymer に変化する性質をもつ)の組合せによって、数種の phenotype があるとされている。^{4,6)} この猿はペットとして飼われる機会も多いので、できるだけ多くの例について、IEF 法の成績を比較し、また、カラムクロマト法をも併用して、前述のように、IEF 上 Q, A のバンドの推定を試みた。Pは先に述べたように、7例のカニクイザルとも認められなかった。なお、Fig. 3a のクロマト図(2)の第3ピークは、従来試みられたデンブング泳動では分離できなかった別の新しい major Hb である可能性が考えられ、IEF 上では、Aに近い pI のバンドに相当するかと推定されるが、詳細についてはなお検討を要する。

カニクイザル以外のものでは、White-tailed Deer もまた、数種の phenotype を示す²³⁾ほか、ベニガオザル、ブタオザルでは、major Hb 2個(α 鎖変異)の組成比の違いによる個体差が報告されている。^{6,23)} 今回の成績では、ベニガオザルの2例に差異はみられなかったが、ブタオザルの3例では個体差が認められ、2つの Hb (A^I, A^{II})⁷⁾の組成比の違いが、カラムクロマト法でも確認できた。以上のように、個体差が現われやすい種属もあるので、これらの種属では、IEF 法で判定を行う場合、留意する必要がある。

なお、PCMB 処理法を用いて、上記カニクイザル、ブタオザルの個体差が、IEF 上 α 鎖変異に基づくことを確認できた。このように、PCMB 処理 Hb では、monomer の変異を IEF 上検知することも可能であった。今回試みた微量検査法を用いると、血液から Hb をとくに分離しなくても、全血のままで行える利点がある。⁸⁾

したがってまた、この方法は、ヒトの異常 Hb 症における異常鎖の検索にも利用できる場合があるのではないかと思われる。

む す び

薄層 PAG IEF 法を用いたヒト Hb と動物 Hb との微量鑑別検査法について報告した。この方法は、各種属 Hb に個有の pI (または分画像)を指標とする検査であるので、種属鑑別上の有用性は高いと考えられる。

とくに、PCMB によって Hb の前処理を行えば、鑑別は一層容易であり、マカク属猿などとヒトとの鑑別も十分可能であった。

要 旨

36種属(ヒト、ヒト胎児、猿類21、一般動物13)のヘモグロビン(Hb)について、薄層 PAG IEF 法によって、人・獣血鑑別検査を試みた。その結果、Fig. 1 に示すような成績を得た。とくに、*p*-chloromercuribenzoate 処理を行った Hb について IEF を行くと、未処理 Hb に比して、ヒトと動物 Hb との鑑別は容易であった(Fig. 2)。なお、各種属 Hb の pI 測定値を Table 1 に表示した。

本論文の要旨は第31回電気泳動学会春季大会において発表した。

実験に供した猿類血液は、京大霊長類研究所共同利用研究員として同研究所より供与を受けたものであり、深甚なる謝意を表する。

文 献

- 1) Bucci, E. and Fronticelli, C.: J. Biol. Chem., **240**: PC 551, 1965.
- 2) Righetti, P. G. and Drysdale, J. W.: Isoelectric Focusing, North-Holland, Amsterdam, 1976, p. 518.
- 3) 大島美奈子他:生物物理化学, **22**: 33, 1978.
- 4) Barnicot, N. A. et al.: Pro. R. Soc. Ser B, **165**: 224, 1966.
- 5) Dayhoff, M. O.: Atlas of Protein Sequence and Structure, Vol. 5, Supl. 2, National Biomedical Res. Found., Washington, D. C., 1976, p. 198.
- 6) Nute, P. E.: Ann. N. Y. Acad. Sci., **241**: 39, 1974.
- 7) Nute, P. E. and Pataryas, H. A.: Am. J. Phys. Anthropol., **40**: 17, 1974.
- 8) 大島美奈子他:医学のあゆみ, **114**: 300, 1980.
- 9) Drysdale, J. W. et al.: Biochim. Biophys. Acta, **229**: 42, 1971.
- 10) Lee, K. S. et al.: Biochim. Biophys. Acta,

(78) 生物物理化学

- 427 : 178, 1976.
- 11) Bunn, H.F. and Drysdale, J.W. : Biochim. Biophys. Acta, **229** : 51, 1971.
 - 12) Kunkel, H.G. et al : J. Clin. Invest., **36** : 1615, 1957.
 - 13) Maita, T. et al. : J. Chem. Soc. Pak., **1** : 5, 1979.
 - 14) Maita, T. et al. : Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem., **359** : 129, 1978.
 - 15) Rosemeyer, M. A. and Huehns, E. R. : J. Mol. Biol., **25** : 253, 1967.
 - 16) Wade, P. T. et al. : Biochim. Biophys. Acta, **221** : 450, 1970.
 - 17) Nute, P.E. and Pataryas, H. A. : Am. J. Phys. Anthropol., **40** : 75, 1974.
 - 18) Mahoney, W.C. and Nute, P. E. : Arch. Biochem. Biophys., **196** : 64, 1979.
 - 19) Maita, T. et al. : J. Biochem., **82** : 603, 1977.
 - 20) Gonenne, A. and Lebowitz, J. : Anal. Biochem., **64** : 425, 1975.
 - 21) Waterman, M.R. : Biochim. Biophys. Acta, **371** : 159, 1974.
 - 22) 宇井信生 : 別冊 ; 蛋白質・核酸・酵素, 共立出版, 1978, p. 38.
 - 23) Kitchen, H. : Ann. N. Y. Acad. Sci., **241** : 12, 1974.