ヒト汗のPAG電気泳動像*

新津ひさえ**・中屋敷徳**

熊谷礼子**・桂 秀策**

Summary

Sweats were obtained from 54 healthy adult men in a sauna. Supernatants of the sweats after centrifugation were dialyzed with deionized water and lyophilized. The sweat samples dissolved in normal saline were tested by PAG-slab electrophoresis. The sweat samples obtained from the 52 men were stained with Coomassie brilliant blue R250 and those from the 54 men were with PAS. The results were as follows: All the sweat samples had one band corresponding with the electrophoretic mobility of serum albumin. Two bands seemed to be important components of sweats were in the α -globulin region of serum. Individual differences of electrophoretic patterns of the sweat samples were found in the regions of α -, β - and γ -globulins. Three glycoprotein components having a individually different mobility were observed in the pre-albumin region.

Key words: sweat, protein, PAG-slab electrophoresis, individual difference.

緒 言

凝集素吸収試験や型的凝集阻止試験などにより血痕の血液型検査を行う場合、その担体に汗が付着していても、汗の型物質が血痕の型判定に殆ど影響しない¹⁾²⁾³⁾。しかし、凝集素解離法⁴⁾、型的二重結合反応法⁵⁾、Mixed cell agglutination reaction (MCAR) 法⁶⁾あるいは酵素抗体法⁷⁾などの鋭敏な検査法による場合は、血痕担体にある汗などの型質による影響は大きく、型誤判の原因ともなる。一方、着衣などから汗を証明し、その血液型を知ること、また、もし汗蛋白に多型があれば、これを利用して法医学で重要な個人識別を行うことができる。以上を文献的に検討する。

Jirka and Kotas⁸⁾は、heat box で集めたエクリン腺とアポクリン腺の汗をポーラログラフィーで検査し、

汗には、ムコ蛋白の性質を有する蛋白があると報告した。Cier ら⁹⁾は、濾紙電気泳動の他に殿粉ゲル電気泳動で、汗を電気泳動し alb の陽極側に 1 本の、陰極側に 3 本のバンドがみられ、 γ -glob の陰極側には 3 本のバンドがあることを観察した。Page and Remington¹⁰⁾はセルロースアセテート膜電気泳動で、少なくとも 3 種の汗の蛋白分画をみており、ある例では、さらにもう 1 種の分画があることを観察した。Jirka and Blanicky¹¹⁾は、ピロカルピンで得た汗をマイクロ等電点電気泳動して数種の分画を観察し、その大部分は PAS 反応が陽性であり、電気泳動像に量的差を思わせる差があることを報告した。Herrmann and Habbig¹²⁾は、寒天電気泳動で汗には 4 分画があるとし、各分画のエステラーゼ活性などを検査した。Uyttendaele ら¹³⁾は、アガロース等速電気泳動を行い、サウナで採取

* PAG electrophoretic patterns of human sweats.

** Hisae Niitsu, Nori Nakayashiki, Reiko Kumagai, Syusaku Katsura, 岩手医科大学医学部法医学教室。
(受付1984年10月11日, 受理1984年11月10日)

(84) 生物物理化学

した汗には主要な3分画があり、その主バンドはalbに相当するとし、またズダン黒B染色により3個のlipophilic分画が、PAS染色により2個の糖蛋白分画が染色されたことを報告した。Rubin and Penneys¹⁴⁾は、汗を2次元ポリアクリルアミドゲル電気泳動し、fluorographyとradioautographyにより検査し、一般には56 spotsをみたが、best preparationでは90 spotsを算え、多くの小変異が個人間にみられることを報告した。

以上のように、電気泳動法、汗濃度などにより、結果は様でないが、ヒト汗には種々の蛋白分画が存在するとみられ、中でも、Jirka and Blanicky¹¹⁾, Herrmann and Habbig¹²⁾, Rubin and Penneys¹⁴⁾の報告は、汗蛋白分画には個人差のあることを示唆している。

汗の血清学的研究では、Jirka and Masopust¹⁵⁾¹⁶⁾は、ウサギ抗ヒト汗血清で二元免疫拡散法を行い、汗には4本の沈降線があり、うち2本は血清成分と考えた。そのうち1本の沈降線は、すべてのヒトにあるとは限らなかったという。また、免疫電気泳動法では5本の沈降線を観察した。Page and Remington¹⁰⁾は、ウサギ抗ヒト汗血清で、二元免疫拡散法を行い、汗には5本の沈降線が生じたといひ、男6人の汗では、抗IgG血清と1本の沈降線を作る5人と、2本の沈降線を作る1人がいたことを報告した。また、汗にIgMがあると思われたのは1人だけであった。さらに、ヒト汗にはIgGなど8種の血清成分を証明した。Herrmann and Habbig¹⁷⁾は、ヒト汗に特異的なウサギ抗ヒト汗血清で、サウナで採取した汗と免疫電気泳動を行い、P₁~P₈と名付ける8本の沈降線を観察した。このうち3本は血清蛋白に由来するalb, Tf, IgGであり、不明の3本の沈降線はエクリン腺の産物であろうと考えた。さらに彼ら¹²⁾¹⁸⁾は、二元免疫拡散法、寒天電気泳動法により、ヒト汗には5種類のエステラーゼがあるとした。Takizawaら¹⁹⁾は、ヒト汗に特異的に反応する沈降素を作り、その抗原は汗の中の分子量約30,000, pI 4の糖蛋白であるとした。

以上、通覧したようにヒト汗には汗個有の蛋白と多型が存在するように考えられる。

実験材料ならびに実験方法

1. 汗

汗は54人の健康男性から採取した。サウナで、まず全身を石鹼で清浄に洗った後、85℃前後の空気に体を

さらし、涌出する汗をプラスチック製ビーカーに集めた。採取した汗は、各々10,000回転20分間遠心し、上清を分取して1.0 μ mの孔を有するメンブランフィルターで濾過して濾液を得た。これを蒸留水で2日間透析し、凍結乾燥し、汗の乾燥重量を計った。

2. PAG 平板ディスク電気泳動

Davis²⁰⁾の方法にしたがい、Polyacrylamide gel (PAG) 濃度が7.5%になるようにして分離ゲルを作製した。Coomassie brilliant blue R250 (C.I.42660, CBB) 染色²¹⁾のための電気泳動には、乾燥汗を生食液で15mg/ml濃度に溶解し、Lowry法²²⁾により蛋白濃度を測定した。そして汗蛋白が0.07mgと一定になるように試料溝に10~30 μ lの汗溶液を添加した。Periodic acid Schiff (PAS) 染色²³⁾のための電気泳動には30 μ lを添加して行った。対照として正常血清の2倍希釈液20 μ lを用いた。泳動には、トリスグリシン緩衝液(pH8.3)を用い、100V、4時間泳動した。なお、同一検体について少なくとも2回反復泳動して検査した。

実験成績

1. CBB 染色像 (Fig. 1, Table 1)

Coomassie brilliant blue R250 (C.I.42660, CBB) 染色による電気泳動像には、血清の γ -, β -, α -各glob領域、alb, pre-alb領域に相当してそれぞれバンドがみられた(Fig. 1)。 γ -glob領域を原点付近と陽極側に分けると原点付近には、52総検体中7検体(13%)に3本のバンドがみられ(Fig. 1, Nos. 7, 22, 36), 34検体に(65%)2本のバンドがみられた(Nos. 6, 45)。その他、1本のもの(13%)や無いものもあった(8%)。 γ -glob領域陽極側にはFig. 1のNos. 6, 45のように多くの汗にバンドはみられなかったが(60%), Nos. 7, 22, 36のように2本出現したものがあり(6%)。またNos. 15, 47, 50のように1本のものもあった(35%)。 β -glob領域には殆どの汗にバンドは生じなかったが(98%)、Fig. 1のNo. 7のように例外的にバンドがみられたものもあった(2%)。Tf領域には多くはバンドが現れないが(83%)、Nos. 22, 36のように1本のバンドがあるものがあった(17%)。 α -glob領域には2~5本のバンドがあり、Nos. 6, 7, 15のように3本のもの(40%)、Nos. 36, 50のように4本あるものが割に多かった(38%)。一方、Nos. 22, 45, 47に示すように5本のバンドを有するものや(8%)、2本しかない例もあった(12%)。また、判定困難な例が1

検体あった。

α -glob 領域のバンドを移動度からみると、血清の α_2 の少しく陰極側に一般に CBB 染色で濃染するバンドがあり、これは52検体全部にみられた。仮に、これを α -glob 領域主バンドと名付けておく。このバンドの陰極側に、少しく離れて α -glob 領域主バンドより淡く染るバンドが51検体 (98%) にみられた。これら

Fig.1. PAG electrophoretic patterns of human sweat and serum, CBB staining.

S: Normal human serum, Nos: Sweat sample numbers.

は、バンドの染色濃度、出現頻度から汗検体の α -glob 領域における二大バンドとみなされる。この主バンドの陽極側には淡い細いバンドが32検体 (62%) にあり、二大バンドの陰極側、すなわち Fig.1, No.22 の α -glob 領域で最も良く染っているバンドの移動度に一致してバンドがみられたものが25検体 (48%) あった。

alb 領域には alb 移動度に一致して総ての汗に1本のバンドがみられた (100%)。pre-alb 領域には淡いバンドが広い範囲にみられ、判然としないが、速く移動するもの (No.47) と遅く移動するもの (No.6)、さらにこれらの両方に広がっているように観られるもの (No.50) があった。しかし読みとれないものもあり、各分画例数を示し得なかった。

2. PAS 染色像 (Fig.2, Table 2)

PAS 染色を行った電気泳動像は Fig.2 に示すように、 γ -glob 領域の原点付近では Nos.45, 47, 15 のように2本のバンドがみられるものは54総検体中20検体 (37%) あり、No.51 のようにバンドのないものは33検体 (61%) あった。 γ -glob 領域の陽極側には、多くの検体でバンドが存在せず (87%)、1~2本みられた検体が少しあった (13%)。 α -glob 領域のバンドをみると主バンドは54検体中52検体 (96%) が、主バンドの陰極側にある二大バンドの1つは46検体 (85%) がそれぞれ染色された。 α -glob 領域主バンドの陽極側には、幅広く染まるバンドが32検体 (59%) にみられた。 alb 領域には濃度差があるが、全例において1本のバンドが存在した (100%)。

Table 1. Numbers and locations of PAG-slab electrophoretical bands of sweat proteins obtained from 52 healthy adult men, CBB staining.

Numbers of bands	Sweat bands in regions of electrophoretical mobilities of serum fractions					
	γ -glob original side	anodal side	β -glob	Tf	α -glob	alb
	Nos. (%)	Nos. (%)	Nos. (%)	Nos. (%)	Nos. (%)	Nos. (%)
5					4(8)	
4					20(38)	
3	7(13)				21(40)	
2	34(65)	3(6)			6(12)	
1	7(13)	18(35)	1(2)	9(17)		52(100)
0	4(8)	31(60)	51(98)	43(83)		
unclear					1(2)	

pre-alb 領域には、移動度の異なる境界の明確でない3種のバンドが存在するように観察された。すなわち、Fig. 2のNos.47, 51のように速く移動するバンドをもつもの(19%), Nos.38, 45のように遅く移動するバンドをもつもの(41%), No.15のように両方のバンドにかかる広いバンドをもつものがあった(41%)。

考 察

1. 汗の中の血清成分

汗に血清成分があるとした報告のうち、albに関しては、Cier ら⁹⁾は濾紙電気泳動でalbの移動度に一致して1本のバンドをみており、Uyttendaele ら¹³⁾は、等速電気泳動で主バンドはalbに相当することを報告した。Page and Remington¹⁰⁾は二元免疫拡散法でIgGはじめalbを含め8種の血清成分が存在することを見出した。またHerrmann and Habbig¹⁷⁾は、汗には血清蛋白に由来するalb, Tf, IgGがあることを報告した。本研究では、54人の男性の汗のCBB染色とPAS染色のいずれにも、対照としたヒト血清のalbと同一移動度を示すバンドがみられ、ヒト汗には血清albに相当する分画があると考えられる結果を得た。以上、汗の採取法、検査法の差などはあるにしても、ヒト汗に血清albに相当する蛋白が存在すると考えられる。

本研究で、 γ -glob 領域の原点付近にバンドをみる汗検体が相当あり、これは澱粉ゲル電気泳動でしらべたCier ら⁹⁾のPost γ , あるいはPage and Remington¹⁰⁾のいう γ -globの陰極側にある分画に相当すると思われる。 γ -glob 領域の陽極側にバンドをみたのは40%で、

Fig.2. PAG electrophoretic patterns of human sweat and serum, PAS staining.
S : Normal human serum, Nos : Sweat sample numbers.

Table 2. Numbers and locations of PAG-slab electrophoretical bands of sweat proteins obtained from 54 healthy adult men, PAS staining.

Numbers of bands	Sweat bands in regions of electrophoretical mobilities of serum fractions				
	γ -glob		α -glob	alb	pre-alb
	original side	anodal side			
	Nos. (%)	Nos. (%)	Nos. (%)	Nos. (%)	Mobility Nos. (%)
4			5(9)		
3			25(46)		fast 10(19)
2	20(37)	1(2)	21(39)		fast 22(41)
1	1(2)	6(11)	1(2)	54(100)	and slow
0	33(61)	47(87)			slow 22(41)
unclear			2(4)		

バンド数は1~2本である。これら γ -glob 領域の原点付近および陽極側に出現したバンドが、 γ -glob に相当すると思われるが、その種類は不明であった。

β -glob 領域における汗の蛋白バンドの存在は濾紙電気泳動⁹⁾¹⁷⁾、セルロースアセテート膜電気泳動¹⁰⁾、免疫電気泳動の各法で認められてはいるが、一般にバンドが存在するという報告は少ない。本研究では、 β -glob 領域における汗蛋白のバンドはCBB染色で僅か1検体にみられたのみであり、この領域に泳動される分画は少ないものとみられる。ヒト汗にTfがあるとした報告があり¹⁰⁾¹³⁾¹⁷⁾、本研究でも血清Tfの付近にバンドをみたものが17%あった。

2. ヒト汗の電気泳動像の多様性について

ヒト汗検体のCBB染色電気泳動像をみるに、検体の蛋白量を0.07mgと一定にして泳動したにもかかわらず、Fig. 1, No.36汗検体のようにalbの濃染するものと、そうでないものがあり、染色程度は検体により異なっていた。PAS染色の電気泳動像でもCBB染色と同様であり、ヒト汗のalb分画には量的に個人差があると推定される。

γ -, β -各 glob 領域, Tf 領域における各バンドについては前項に述べたが、これら領域におけるヒト汗検体バンド数、位置に多様性があり、これは、汗検体のこの分画蛋白に濃度差があることを考慮にいれても、なお多様性を否定することはできないと考えられる。

α -glob 領域に汗蛋白の分画があることは知られており⁹⁾¹⁰⁾¹³⁾¹⁸⁾、Page and Remington¹⁰⁾は、セルロースアセテート膜電気泳動で、この領域に最も強いバンドがみられたとしている。本研究では、CBB染色でもPAS染色でもこの領域の主バンドはほぼ総ての汗検体に良く染色されてみられた。Herrmann and Habbig¹⁸⁾は、 α -globの移動度をもつ非特異的なカルボキシエステラーゼは血清蛋白由来であろうとしたが、それは別として、本研究でみられた α -glob領域主バンドは、汗の重要な成分の1つと考えられる。ただ、その量ないし汗の他のバンドに対する比率は一定ではないと思われる。 α -glob領域主バンドの陰極側にもほぼ全検体に出現するバンドがあり、この二大バンドは汗特有のものと推定される。

一方、この二大バンドを含め、 α -glob領域には2~5本のバンドがみられ、特にFig. 1 No.22のように、主バンドのCBB染色が淡く、その陰極側にあるバンドが最も濃く染るという検体もあり、 α -glob領域に

も電気泳動像に多様性がみられる。

pre-alb領域に汗蛋白分画があるとされており⁹⁾¹⁰⁾、Takizawaら¹⁹⁾は、この領域に泳動される糖蛋白がヒト汗の特異抗原であるとしている。本研究でも、PAS染色で移動度の異なる3種のバンドを観察しており、この領域におけるバンドにも多様性がみられる。

以上、ヒト汗検体には、各領域においてバンドの多様性の存在することについて述べたが、汗検体はただ1回の採取により得た汗を検査したものであり、採取する時期または方法を変えて反復検査し、同一人が同一の電気泳動像を示すならば、上述のバンドの多様性は個人差によると考えることが出来るであろう。

要 旨

サウナで採取した健康な男性54名の汗についてPAG平板ディスク電気泳動し、CBB染色とPAS染色を行い、次の結果を得た。ヒト汗には血清に相当するバンドが全例において認められ、 α -glob領域には汗の重要な成分と思われる2個のバンドがみられた。 α -, β -, γ -各 glob 領域で汗バンドの多様性がみられた。pre-alb領域には移動度の異なる3種の糖蛋白と思われるものがあつた。

文 献

- 1) 石井康允：長崎医学会誌，29：630，1954.
- 2) 中嶋八良，川村一枝：犯罪学誌，22：31，1956.
- 3) 実繁幸男他：科警研報告，31：13，1978.
- 4) Yada, S. : Japan, J. Med, 16 : 290, 1962.
- 5) 赤石 英他：日法医誌，19：181，1965.
- 6) 有馬 孝：科警研報告，32：181，1979.
- 7) 井上晃孝，岡田吉郎：日法医誌，32：66，1978.
- 8) Jirka, M. and Kotas, J. : Clin. Chim. Acta, 2 : 292, 1957.
- 9) Cier, J.F. et al. : C.R.Soc. Biol, 157 : 1623, 1963.
- 10) Page, C.O. and Remington, J.S. : J. Lab. Clin. Med, 69 : 634, 1967.
- 11) Jirka, M. and Blanicky, P. : Clin. Chim. Acta, 31 : 329, 1971.
- 12) Herrmann, W.P. and Habbig, J. : Arch. Dermatol Res, 255 : 63, 1976.
- 13) Uyttendaele, K. et al. : J. Chromatogr, 132 : 261, 1977.
- 14) Rubin, R.W. and Penneys, N.S. : Anal. Bio-

(88) 生物物理化学

- chem, **131** : 520, 1983.
- 15) Jirka, M. and Masopust, J. : Nature, **199** : 283, 1963.
- 16) Jirka, M. and Masopust, J. : Biochim. Biophys Acta, **71** : 217, 1963.
- 17) Herrmann, W.P. and Habbig, J. : Arch. Dermatol Res, **255** : 123, 1976.
- 18) Herrmann, W.P. and Habbig, J. : Br. J Dermatol, **95** : 67, 1976.
- 19) Takizawa, H. et al. : Proc. Japan Acad, **59 B** : 243, 1983.
- 20) Davis, B.J. : Ann. N. Y. Acad. Sci, **121** : 404, 1964.
- 21) 月刊 Medical Technology 編 : 電気泳動法のすべて, 1 版, 医歯薬出版株式会社, 東京, 1983, p17.
- 22) Lowry, O.H. et al. : J. Biol. Chem, **193** : 265, 1951.
- 23) 電気泳動学会 : 電気泳動便覧, 1983, p42.