Albumin および Globulinpheresis に伴う 血清蛋白質の変動について

(指導 教授 島藺順雄)

東京大学医学部生化学教室

東 惠 彦

長 谷 川 福 市

Changes in Serum Proteins by Albumin- and Globulinpheresis

By Tokuhiko Higashi and Fukuichi Hasegawa

(From the Department of Biochemistry, Faculty of
Medicine, University of Tokyo)

In order to obtain some additional findings in the research for the formation of plasma proteins, authors have carried out two types of experiments with dogs and rabbits which might be called albuminphersis and globulinpheresis. These have the similar character as plasmapheresis performed by Whipple and others. In albuminpheresis or globulinpheresis, a certain volume of blood was withdrawn from animals, and blood cells were separated from plasma by centrifugation, washed twice with saline, suspended in globulin or albumin solution respectively which had been previously prepared from pooled plasma of the same species, and the resulting mixture, having approximately the same volume and concentration of globulin or albumin as depleted blood, was injected back into animals intravenously.

By these procedures, animals were brought under the condition in which albumin or globulin fraction was partially lost while other blood components were remained almost unchanged. Changes in serum proteins after these treatments were analyzed at intervals by the micro-Kjeldahl method and the electrophoresis using a Tiselius apparatus.

In this report, it has been shown that the decrease in albumin and the increase in α - and β -globulin have been observed with some differences in details between albumin- and globulinpheresis. Furthermore, on the basis of the results obtained, some discussions have been made about the formation of serum proteins in relation to the labile tissue protein.

血漿蛋白質が体外に亡失した場合、例えば外科手術や外傷時の出血の際に、血漿 Albumin の値が低下することは、肝臓疾患、炎症性病変、栄養失調時にもみられる同様の変化と併せて、血漿蛋白質ことに Albumin の体内生成の問題やその生理的意義に関していろいろの示唆

を与えるものである。

Whipple らは、血漿蛋白質の体外亡失を実験的に再現するために Plasmapheresis (一旦採血をした後にその血球部分だけを返す) を行い、Albumin 値の減少を主とする血漿蛋白質の変動を追究し、種々の条件下にお

けるその再生補充の状況を観察して、組織中の易動性蛋白質と血漿蛋白質との間に動的平衡の存在することを推論指摘している。平井、島尾²⁾は、瀉血漿、瀉血球、および実験的急性炎症時の血漿蛋白質の変化を電気泳動法によつて分析し、同様 Albumin の絶対的減少とこれに伴伴する α -globulin の増加を報告し、A/G 比の低下を説明する理論的解釈を試みている。

著者らはこのような問題をさらに検討する目的で、血漿蛋白質中のある特定の分画を損亡せしめた結果生じる動物体内の血漿蛋白質の変化を追究してみた。すなわち、実験動物より Albumin のみを損亡せしめる方法——本著ではこれを Albuminpheresis と名づける——、Globulin のみを損亡せしめる方法——Globulinpheresis——を行い、その結果招来された血清蛋白質の変動を、micro-Kjeldahl 法と Tiselius 電気泳動法によつて分析研究したので、ここにその実験結果を報告する。

実験方法

I. 犬についての実験

1) Albumin 溶液

ブールした正常犬血清を材料とし Cohn の低温低イオン強度エタノール分画法 (Method 6)³⁾ を用いて FV 分画を分離精製した。本分画の電気泳動分析値は、Albumin 85%, α - および β -Globulin 15% で、この分画を凍結乾燥してえた粉末を生理的食塩水で蛋白濃度 4% になるように溶解し、滅菌濾過したものを実験に供した。

2) Globulin 溶液

ブールした正常犬血清から同様の方法によつて FII + III 分画 (ただしエタノール終末濃度は 20% とした) を分離精製した。この分画の電気泳動による分析結果は、 α - および β -Globulin 30%, γ -Globulin 70% であったが、これを同様 4% 無菌溶液として使用した。

3) Albuminpheresis

17~20kg の正常犬をラボナール溶液 (0.25g/10ml) 静注によつて麻酔し、股静脈から約 300ml 採血する。この際あらかじめクエン酸ナトリウム又は A.C.D. 溶液* を加えて凝固を防ぐ。直ちに遠心して血漿を除去し、2 倍量の滅菌クエン酸ナトリウム液 (又は A.C.D. 液) で 1 回、滅菌生理的食塩水で 1 回血球を洗浄し、遠心分離によつて洗浄液をすてる。ついでこの血球部分に

Globulin 溶液を加えて採血量と等量にして混和し、股静脈から注入する。以上の操作はすべて外科的無菌の状態で行う。これによつて主として Albumin の亡失した状態が作りだされたことになる。

操作前および操作後適当な時間の間隔において 5ml づつ採血し、血清総蛋白量および血清非蛋白性窒素の測定は micro-Kjeldahl 法により、蛋白分画の分析は Tiselius 電気泳動法 (磷酸緩衝液を用い、電気泳動実施規定による) によつて行い、それぞれの変動を追究した。同時に体重の測定をも併せて実施した。

4) Globulinpheresis

上述の Globulin 溶液の代りに Albumin 溶液を用いて全く同様の操作を実施した。これによつて主として Globulin 分画だけが減少した状態をつくりだし、その後の血清蛋白質における変化を同様に観察した。

5) β -Globulinpheresis

FV (Albumin) および FII + III (Globulin) 分画を適当な割合に混合して、Albumin, α - および γ -Globulin の濃度が血清のそれとほぼ同じで、主として β -Globulin だけが減少している溶液をつくり**、同様に採血、分離、洗浄した血球をこの溶液に浮遊して注入し、同様の測定を実施した。

II. 兎についての実験

犬の場合とほぼ同様にして Albumin および Globulinpheresis を行つた。採血量は 1 回 30ml とし、犬の場合と違つてこれを毎日 1 回づつ 3 日間繰返して Pheresis の効果を強めることにした。電気泳動分析は Veronal 緩衝液 (pH 8.6, $\mu=0.1$) を用いて実施した。

実験結果

1. Albuminpheresis

a) 犬についての実験

実験例 3 例のうちから代表的な 1 例を選んでその実験結果を第 1 表に示す。他の 2 例についてもほぼ同様の結果がえられたが、次のような点が観察される。

1. 実験に伴う体重の変動は余りない。
2. 操作直後の血清総蛋白質量の減少および電気泳動分析値の変化は予期される通りである。
3. 総蛋白量は急速に恢復し、むしろ操作前より高い値を持続するが、それは主として Albumin 分画の増量に基づくものである。

* クエン酸 4.8, クエン酸ナトリウム 13.2, Dextrose 13.3 g/dl の濃度の混合液で、血液 200ml に対してこの液 50ml を加える。

** 例えば、上述の Albumin 溶液 (4%) と Globulin 溶液 (6%) とを 85:15 の容量比に混合する。 α -Globulin も幾分減少することは免れない。

第1表 Albuminpheresis (犬)

採血時	体 重 (kg)	血清総蛋白量(g/dl)	電 気 泳 動 分 析 値* (%)				A/G	血清非蛋白窒素 (mg/dl)
			A	α	β	γ		
操作前	16.9	5.4	50.0	14.0	26.2	9.8	1.00	50
〃 後	—	4.8	48.3	11.4	28.2	12.1	0.94	54
第1日	16.2	5.5	45.6	13.0	31.3	10.1	0.84	48
〃 2 〃	—	5.5	49.5	12.4	29.2	9.0	0.98	27
〃 3 〃	—	5.9	50.8	12.7	28.6	7.9	1.03	32
〃 4 〃	16.5	6.0	54.3	12.3	24.6	8.8	1.19	38
〃 6 〃	16.3	6.1	50.6	13.8	25.6	10.0	1.02	40
〃 10 〃	16.3	6.3	51.0	13.3	25.5	10.2	1.04	32

* A; Albumin: α, β, γ; α-, β-, γ-Globulin.

第2表 Albuminpheresis (兎)

採 血 時	血清総蛋白量 (g/dl)	電 気 泳 動 分 析 値 (%)				A/G	血清非蛋白窒素 (mg/dl)
		A	α	β	γ		
第1回操作前	6.0	62.5	7.5	13.9	16.2	1.67	—
第3回 〃 後	4.3	51.3	12.0	21.9	14.8	1.05	32
12 時間後	—	50.0	12.9	26.5	10.6	1.00	—
24 〃 〃	4.7	64.8		26.0	9.2	—	58
48 〃 〃	4.9	49.3	13.8	29.8	7.3	0.97	—
3 日 後	5.8	44.0	19.1	28.5	8.4	0.79	49
4 〃 〃	6.0	48.3	45.2		6.5	0.94	45
6 〃 〃	5.6	56.6	11.2	24.2	7.9	1.30	56
7 〃 〃	5.5	56.1	6.5	25.8	11.5	1.28	64
9 〃 〃	5.7	62.7	7.4	18.8	11.1	1.68	30

第3表 Globulinpheresis (犬)

採血時	体 重 (kg)	血清蛋白量 (g/dl)	電 気 泳 動 分 析 値 (%)				A/G	血清非蛋白窒素 (mg/dl)
			A	α	β	γ		
操作前	17.0	6.3	46.2	11.5	30.8	11.5	0.86	32
〃 後	—	5.6	46.5	11.5	29.8	12.0	0.87	46
第1日	16.8	5.4	44.0	15.0	29.0	12.0	0.79	39
〃 2 〃	—	5.7	41.6	15.3	30.6	12.5	0.71	35
〃 3 〃	16.1	6.2	41.2	13.5	32.9	12.4	0.70	35
〃 4 〃	—	5.5	42.3	14.1	32.8	10.8	0.73	—
〃 5 〃	16.5	5.6	43.5	13.9	31.7	10.9	0.77	46
〃 7 〃	16.9	6.9	40.3	14.7	32.3	12.7	0.68	29
〃 10 〃	—	5.8	45.8	11.7	29.8	12.7	0.85	43

4. 第1日目に Albumin がさらに相対的には減少することが目につく。ただしその後は急激に増加してゆく。

5. 第1日目に α - および β -Globulin の増加が観察される。

6. 非蛋白性窒素の変動は少い。

b) 兎についての実験

実験結果は第2表に示す通りである。前後3回にわたって Pheresis の操作を行つたことと、動物が小さいために測定用採血の影響が大きく現れる恐れがあることを考慮にいれなければならないが、犬で観察された Albumin の減少や、 α - および β -Globulin の増加はさらにはつきりとこの表に現れている。Albumin の回復が犬の場合に比べてそれ程早くないことは上述の条件を考えれば充分説明がつく。

対照として操作しない兎について同様の頻度に採血して血清蛋白質の変動域を調べたが、Albumin 61.7~65.7%, α -Globulin 8.0~10.9%, β -Globulin 11.0~14.2%, γ -Globulin 13.2~15.0% であつた。

II. Globulinpheresis

a) 犬についての実験

前同様に3例中から代表的なものを第3表としてかかべるが、これから観察される点は次のとおりである。

1. 操作後の総蛋白質量の減少は当然であるが、Globulinpheresis の影響は急速に補われるらしく、3例の何れも操作後数時間で採血した血清では Pheresis の効果が打消されて明らかなでないような分析結果となつている。

2. 血清総蛋白量の回復は Albuminpheresis と違つて極めて徐々である。3日後に極大値を示しているが、これは α - および β -Globulin の増量に起因しており、この際 Albumin の百分率は低い。

3. 操作後2~3日後まで Albumin が減少し、ついで次第にもとにもどるが、その時間は Albuminpheresis の場合より長くかかり、また操作前の値を起える程の増加は示さない。

4. α - および β -Globulin がかなり長い期間にわたつて高い値を示している。Plasmapheresis の際の知見²⁾ とほぼ軌を一にして、Albumin 量の低下に伴う α -Globulin 量の上昇が観察され、従つて Albumin+ α -Globulin 値がかなりよく一定に保たれている。

b) 兎についての実験

7例の実験から1例を選んで第4表に示すが、結果は犬の場合とほぼ同様である。ただ Albumin の減少と α -Globulin の増加が犬の場合程明らかなでないが、Albumin+ α -Globulin 値はかなりよく一定しているので、これは電気泳動分析上の Albumin と α -Globulin の分離の問題に原因するとも起えられる。

III. β -Globulinpheresis

犬について行つた実験3例中から1例を選んで第5表に示す。この結果から次のようなことが見出されるが、総じて Globulinpheresis の結果と同様である。

1. Albumin の著しい減少が第1日目に観察され、百分率はかなり長い間低い。

2. α -Globulin の増加が長期間みられる。

3. β -Globulin は操作後急激に増加する。

第4表 Globulinpheresis (兎)

採 血 時	血清総蛋白量 g/dl	電 気 泳 動 分 析 値 (%)				A/G	血清非蛋白 窒素 (mg/dl)
		A	α	β	γ		
第1回操作前	5.0	64.6	10.4	13.6	11.4	1.82	17
第3回 〃 後	3.9	68.3	7.6	11.4	12.6	2.16	22
12 時間後	4.3	64.7	8.5	17.0	9.8	1.83	45
24 〃 〃	4.3	63.1	8.3	15.5	13.1	1.71	43
36 〃 〃	4.6	60.2	9.7	17.2	12.9	1.52	11
54 〃 〃	5.0	62.2	6.6	17.6	13.2	1.67	17
3 日 後	5.2	62.8	7.3	19.0	11.0	1.69	32
4 〃 〃	5.2	62.4	8.6	16.1	12.9	1.66	19
5 〃 〃	5.7	60.5	11.6	16.3	11.6	1.53	15
9 〃 〃	5.4	63.7	10.3	13.8	12.0	1.75	25

第5表 β -Globulinpheresis (犬)

採 血 時	血清総蛋白量 (g/dl)	電 気 泳 動 分 析 値 (%)				A/G	血清非蛋白 窒素 (mg/dl)
		A	α	β	γ		
操 作 前	6.0	47.3	12.8	30.0	10.0	0.90	35
〃 後	5.5	49.1	12.8	27.2	10.9	0.97	32
第 1 日	5.8	37.0	15.1	34.2	13.7	0.59	46
〃 2 〃	5.5	43.8	14.6	28.3	13.4	0.78	43
〃 3 〃	7.1	41.3	13.1	30.4	15.2	0.71	57
〃 4 〃	6.2	46.9	14.8	27.2	11.1	0.89	27
〃 5 〃	6.3	44.8	15.0	29.0	11.2	0.81	31
〃 7 〃	6.3	45.3	12.7	28.8	13.2	0.83	29
〃 10 〃	6.9	46.3	14.4	28.8	10.5	0.86	16

4. 血清総蛋白量の恢復に際して3日後に極大値がみられる。

考 察

前述の Whipple らの報告の他に N^{15} や C^{14} で標識した血漿蛋白質を用いての多くの研究から extravascular exchangeable plasma protein⁴⁾ の存在を含めて、組織蛋白質と血漿蛋白質との間に動的な平衡が維持されているという考え方が強い。また同種の実験から Albumin に比べて Globulin の方が turn over が早いことも知られている⁵⁻⁷⁾。

著者らの実験において A/G 比を増加させても (Globulinpheresis), また逆に減少させても (Albuminpheresis), とともにその後に A/G 比の減少が起ること, いいかえれば Albumin の減少と α -および β -Globulin の増加がみられることが明らかである。また A/G 比減少の程度や恢復に要する時間は, どちらかといえば前者の方が大きいように思われる。この実験結果は, Globulin の turn over が Albumin のそれよりもかなり大きいことを推定させるし, Pheresis をうけた分画の補填が特に Globulin では急速に行われるものと考えられる。

Albumin の減少と α -Globulin の増加とがよく関連する^{2,9,10)} ことや, Albumin のいろいろな性質から推して, Albumin から一部の Globulin が作られるという説が一般に行われ, これを支持する報告もみられる¹⁰⁻¹²⁾。著者らの実験事実もまたこの線に沿って充分解釈することができる。

しかし一方全く逆な方向, すなわち一部の Globulin が Albumin の前駆体になるという考え方で, 本著の観察結果を説明することも可能である。それによれば急激な血漿蛋白質の損失を補うために組織蛋白から動員され

る labile な分画が α -あるいは β -Globulin 位の蛋白質中に含まれ, この種の蛋白質が Albumin 生成の素材となるものと推定されるが, 現在のところ, これらの両説の取捨はにわかに断じがたい。Isotope で標識した Albumin および Globulin 分画を用いて本実験を繰返す必要があると同時に, 組織蛋白質に関する研究が望まれる。

Globulinpheresis の場合に操作3日後位に血清蛋白質が著しく増加して極大値を示す事実は, 理由は明らかでないが, 興味のあることと思われる。

α -および β -Globulin 位の血漿蛋白質分画中には, 種々な性質の蛋白質が混在しているが, それらに関する知見はまだ充分ではないので, 本実験におけるこれらの分画の増量がどの蛋白質に帰因するかを明らかにすることは容易でない。糖蛋白質や脂蛋白体もこの分画中に含まれることを考え合せて, あるいは蛋白質以外の成分に対しても考慮を払う必要があるかもしれないが, 今後の研究にまつべき問題である。

総 括

Plasmapheresis にならつて, 犬および兎に Albuminpheresis, Globulinpheresis を行い, その後の血清蛋白質の変動を追究し, Albumin の減少と, α -および β -Globulin の増加を主とするその実験結果を報告し, それに基いて 2, 3 の考察を試みた。

終りに御指導御校閲をいただいた島蘭教授, 平井助教授に対し, また実験上の便宜を供与された日本製薬販売株式会社に深甚の謝意を表する。また一部の実験に御協力いただいた長友清寺真学兄に感謝する。

文 献

- 1) Whipple, G. H., Madden, S.: *Physiol. Rev.*, **20**, 194 (1940)
- 2) 平井秀松, 島尾和男: *生化学* **25**, 165 (1953)
- 3) Chon, E. J., Strong, L. E., Hughes, W. L. Jr. Mulford, D. J., Ashworth, J. N., Melin, M., Taylor, H. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **68**, 459 (1946)
- 4) Steinbock, H. L., Tarver, H.: *J. Biol. Chem.*, **209**, 127 (1954)
- 5) Yuile, C. L., Larnson, B. G., Miller, L. L., Whipple, G. H.: *J. Exptl. Med.*, **90** 297 (1949); **93**, 539 (1951)
- 6) Bartlett, P. D., Gaebler, O. H.: *J. Biol. Chem.*, **196**, 11 (1952)
- 7) Niklas, A., Maurer, W.: *Biochem. Z.*, **323**, 89 (1952)
- 8) Gjessing, E. C., Ludewig, S., Channatin, A.: *J. Biol. Chem.*, **174**, 683 (1948)
- 9) Zeldis, L. J. Alling, E. L., McCood, A. B., Kulka, J. P.: *J. Exptl. Med.*, **82**, 157 (1952)
- 10) Roberts, S., White, A.: *J. Biol. Chem.*, **180**, 505 (1949)
- 11) Maurer, W., Müller, E. R.: *Biochem. Z.*, **326**, 474 (1955)
- 12) Roberts, S., Kelley, M. B.: *J. Biol. Chem.*, **222**, 555 (1954)

W. Laurie, J. D. Woods, M. B. Wsraud: Atherosclerosis and its cerebral complication in the south african Bantu. *The Lancet* No. 7014, Vol. 1, (1958)

動脈硬化症と動脈硬化にともなう脳合併症(南アフリカバンツにおける)〔要約〕従来, 南アフリカの未開バンツ族においては文明社会に比して, Atheroma およびそれにともなう脳合併症はきわめて稀であると諸氏, (Higginson and pepler (1954), (Becker (1946), Edington's (1954), Humphries (1957), Bersohn (1955) が報告し, これがまた, 臨床的に認められて来たが,

Becker (1946) は 3000 の死体解剖にて Bantu における sclerose は稀ではないが, 直接死因となることは少いと報告した。著者は同じく Bantu 族の 19 才以上の 300 例の連続的屍体解剖において脳出血および血栓をもつもの 31 例を発見し, これを動脈硬化の程度により分類, または性別, 年令別の考察を Becker (1946) の報告と比較検討して, Bantu 族において動脈硬化は普通であり, また脳合併症にて死亡することも稀でないと反論している。また入院患者は男子の方が多かったにもかかわらずこの脳合併症は女子に多く見られたということは興味があると述べ(これはヨーロッパの下降とは反しているといっている)また 27 才の男子で潰瘍性動脈硬化があるといつている。

さらに 5700 人の入院患中臨床診断にて 37 人の純粹の Atherosclerosis による Ceebral Catastrophes を見たと報告している。

B. L. Antonaci and G. Macagnino.; Electrophoretic Studies of Serum aud of Oedema Fluid, *Act. Med. Scand.* Vol CLIX, II, 133~136 (1957)

われわれは各種疾患 20 例の浮腫液および血清の蛋白成分を研究するために Paper-electrophoresis を応用して行つた。(症例は, 心不全 12 例, anasarcous syndorome 2 例, lipoid mephrosis 1 例, 妊娠 1 例, 補液治療の過度によつて招かれた腹水の 1 例, 門脈性硬変症 1 例)①腹水においては平均総蛋白量は 0.67g/dl であつたが, 1 例のみ総蛋白量が 1.35g/dl であつた。②Alfumin は腹水では平均 48.3% で, 血清では平均 39.4% であつた。③腹水における Globulin は血清に認められる分層は全て出現している。平均ではおのおのの比率は血清におけるよりもわずかに低値を示し, その平均を見ると α_1 7.3%, α_2 7.3%, β 11.9%, γ 22.2% である。血清では α_1 6.8%, α_2 11.7%, β 14.8%, γ 27.1% である。④腹水の A/G 比は血清より高く, 平均値は血清で 0.67, 腹水では 1.06 であつた。

以上のことから結論として, ④浮腫液には血清に見られる全ての蛋白分画が認められる。⑤血管障得により末梢器官に滲透する蛋白分画比は第一にその血清の分画比に左右されまた第 2 にはその分子量により左右されるごとくである。