人血清蛋白の沱紙電氣泳動法の基礎的研究

I 沱紙面上の緩衝液流およびイオン強度の泳動像に及ぼす影響

京都大学医学部内科第一講座 (指導 脇坂行一教授)

山 口 延 男

Fundamental Studies on Paper Electrophoresis of Human Serum Protein.

I. On the Buffer Flow and Ionic Strength on Paper Surface and Their Influences on the Electrophoretic Migrations and Patterns.

Nobuo Yamaguchi

(1st Division, Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine, Kyoto University; Gyoichi Wakisaka)

A systematic studies of the electrophoresis technique of human serum proteins (in sodium barbiturate buffer at pH 8.6) using the open horizontal method were carried out.

1. During electrophoresis, two kinds of the buffer flow occur on paper surface, one of which heads for the cathode on account of the electroendosmosis. The other one goes to the central part of paper from both of the anodic and cathodic buffer vessels in order to compensate for the relative dryness which occurs owing to the evaporation during electrophoresis. The apparent buffer flow on paper surface is the algebraic sums of these two kinds of buffer flow. The equilibrium points (zero points) of buffer flow are generally located on the cathodic part of the horizontal portion of paper.

2. These equilibrium points, however, displace to the central part of paper as voltage, ionic strength and electrophoresis hour increase. It is because, in these cases, the buffer flow due to the evaporation augments more rapidly than the one due to the electroendosmosis.

3. The buffer flow on the more anodic part than the equilibrium points heads for the cathode and inversely on the more cathodic part. Their dimensions are proportional to the distances from the equilibrium points of buffer flow.

4. On account of the buffer flow on paper, 1) the electrophoretic patterns are blurred, especially on the anodic part of paper, and displaced, as a whole, to the anodic or cathodic parts, leaving some extent of tailing on paper. This is disadvantageous for the precise determination of serum fractions because one fraction may be superimposed on the other's tailings.

5. As the buffer solution displaces under the continuous evaporation during electrophoresis, the ionic strength varies throughout on paper. To detect the variations of ionic strength, accumulated amounts of electrolytes on the dried papers, were examined by the high-frequency papyrography. The ionic strength is proved to be small where the buffer flow is large. So, the ionic strength on paper decreases in proportion to the increases of distance from the equilibrium points of buffer flow.

6. The time-migration relationship of B.P.B. stained Alb, is not linear but of inversely S-shaped curve, the formation of which is expounded to be due to the variations of ionic strength on paper.

7. The most well separated electrophoretic patterns are obtained when serum is applied on the equilibrium points of buffer flow. It is because the applied serum migrates on the paper with relatively high ionic strength and relatively small buffer flow.

8. In drying papers, the electrophoretically separated fractions are displaced owing to the water displacement due to the evaporation.

9. The paper electrophoretic mobilities are only approximate in both of the closed and open method electrophoresis because the changes of buffer flow and ionic strength during electrophoresis, and the water displacement in drying papers do not take place uniformly on paper.

緒 論

血清蛋白の汙紙電気泳動法の方法論的基礎はすでに本法発表初期⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾⁽⁴⁾⁽⁵⁾⁽⁶⁾⁽⁷⁾⁽⁸⁾ およびその後の Grassmann & Hannig⁽⁹⁾⁽¹⁰⁾, Macheboeuf et al.⁽¹¹⁾⁽¹²⁾, Kunkel⁽¹³⁾, Durrum⁽¹⁴⁾, McDonald⁽¹⁵⁾ らの報告によってほぼ確立されている。しかし最近 Crook et al.⁽¹⁶⁾, Jencks et al.⁽¹⁷⁾, Pieper⁽¹⁸⁾, 島尾⁽¹⁹⁾⁽²⁰⁾ らは定量法ことに在来の densitometry に原理的な欠陥がある事を指摘し、1955 年の London の Paper electrophoresis についての Symposium⁽²¹⁾ では、血清蛋白の汙紙電気泳動法の泳動操作および定量法の全般について種々の問題点があることが論じられている。一方我が国においては、1952 年頃小林⁽²²⁾⁽²³⁾, 佐野⁽²⁴⁾ らによつて初めて血清蛋白の汙紙電気泳動法が紹介されて以来多数の方法論的研究および臨床的研究が発表されている。しかし、近年泳動条件、染色条件、定量方法などの相違によつて、定量成績にかなりの差異のあることが注目され⁽²⁵⁾⁽²⁶⁾、1956 年には、電気泳動学会によつて汙紙電気泳動標準作法試案が発表された。血清蛋白分画の定量法の再検討が重要な問題にあることは当然であるが、汙紙電気泳動像と泳動条件、泳動操作およびその他の実験条件の再検討も定量法的前提として同様に重要なことは明らかである。

汙紙電気泳動装置には、汙紙面よりの緩衝液の蒸発を防ぐ closed method⁽¹⁴⁾ (ガラス板法, sandwich technique⁽¹⁵⁾, Kunkel & Tiselius⁽⁷⁾: direct solvent immersion technique⁽¹⁵⁾, Cremer & Tiselius⁽⁹⁾, Consden & Stanier⁽²⁷⁾) および蒸発を許容する open method⁽¹⁴⁾ (水平法, horizontal strip method⁽¹⁴⁾, Wieland⁽¹⁾, Grassmann & Hannig⁽⁵⁾⁽⁸⁾, McDonald et al.⁽¹⁵⁾: 懸垂法, hanging strip method⁽¹⁴⁾ ridge pole type⁽¹⁵⁾, Flynn & de Mayo⁽²⁸⁾, Durrum⁽²⁹⁾), が分類されている。closed method では泳動距離-時間関係は直線的であるが⁽⁷⁾, 泳動像の分離は良くない⁽²⁹⁾ (暗電流の存在-森⁽³⁰⁾) のに反して、open method では泳動距離-時間関係は一定条件⁽¹⁴⁾ を除いては直線的でないが泳動像の分離は優っていることが知られている⁽¹⁴⁾ ⁽³¹⁾。open method では泳動中に蒸発によつておこる汙

紙面上の緩衝液流やその他の実験条件の変化が、泳動距離-時間関係や泳動像の分離状態に大きな影響を及ぼしていることが当然考えられる。著者はとくに水平型汙紙電気泳動装置 (open method) を用いて血清蛋白の汙紙電気泳動像と諸種の実験条件の変化との関係について一連の実験的検討を試みた。

本報では汙紙面上の緩衝液の移動および緩衝液濃化と泳動像との関係について報告する。

実験方法

(1) 泳動装置: 東洋汙紙株式会社製汙紙電気泳動装置 C S 号器 (水平型) を使用した。白金電極を直接緩衝液槽内に挿入し、ブリッジを用いて連結した別の緩衝液槽内に泳動用汙紙端が浸るようにした。

(2) 電源装置: 上記会社製直流発生装置 II-13 号 (最大電圧: 1000V, 最大電流 40mA) を使用し、定電圧条件で実験を行なった。必要に応じて泳動装置を 1~6 台並列に連結して使用した。

(3) 緩衝液: Veronal Veronal Soda 緩衝液 (略記, V. V. Na 緩衝液), pH 8.6, $\mu=0.05$ を使用した。緩衝液量は毎回 740ml を使用し 両側の緩衝液槽に平等に分配されるようにした。

(4) 汙紙: 東洋汙紙 (略記 T. R.) No. 51 を用いた。15.5cm×37.5cm の大きさに切断した汙紙を使用し、汙紙の線維の梳き目の方向に電場がかかるように泳動した。汙紙水平部の長さは 25.5cm (汙紙保持枠外側端間) で、この両側から汙紙が各々 6cm ずつ緩衝液槽へ垂れるようにした。汙紙水平部から緩衝液面までの距離は 3.5cm である。試料塗布位置は実験目的によつて変えたのでその都度記載した。

(5) 泳動操作: 汙紙をあらかじめ緩衝液中に浸して平等にうるおしたのち、汙紙保持枠に装着し、これを泳動装置内の所定に置き、ついで装置をガラス板で密閉し、約 30 分後試料血清を塗布し、さらに約 10 分後通電した。

(6) 試料および試料塗布法: 血清は正常 5 人例から早朝空腹時採血し、血清分離後等量ずつ混合したものを使用した。汙紙面上の緩衝液の移動の大きさを知るために

20% glucose 溶液 (泳動中の緩衝液の移動), および bromphenol blue 水溶液 (略記, B. P. B.: 沔紙乾熱後の緩衝液の移動) を用いた。なお glucose は V. V. Na 緩衝液中では帯電せず全く緩衝液流によつてのみ移動し⁷⁹⁾, また沔紙を乾熱すると褐色斑となつて検出される。試料塗布には 0.05ml 目盛のマイクロピペットを使用し血清を塗布する場合には, Grassmann & Hannig の手技¹⁰⁾に従つた。

(7) 蛋白の固定および染色²⁵⁾: 泳動終了後沔紙を保持枠にかけたまま水平に泳動装置から取り出し, 緩衝液に浸つていた沔紙部分を切り取つたのち, 著者の設計に従つて製作させた沔紙乾熱器 (熱源部が沔紙面の上部に位置するように設計されている) を用いて 100°C, 20 分間乾熱後, 0.2% Amidoschwarz 10 B で染色し, 2% 酢酸水を用いて脱色し空气中で乾燥した。

(8) 乾熱沔紙上の電解質分布の測定: 泳動後の乾熱沔紙上の析出電解質の分布は, 柳本株式会社製高周波パピログラフを用い, 沔紙上の透電率の変化として測定した。

実験成績

1. 沔紙面上の緩衝液流

緩衝液流の性質およびこれによる試料の移動について知るために次の実験を行なつた。15.5cm×37.5cm の沔紙 (T. R. No. 51) の水平部の陰極端 (緩衝液面から 3.5cm) からそれぞれ 3.5, 5.5, 9.5, 13.5, 17.5, および 21.5cm の所に 20% glucose 0.005ml を塗布して泳動を行なつた。泳動後沔紙を乾熱して glucose 位置 (褐色斑点) を検出した。Fig. 1, 2 は電圧 200V および 400V で泳動時間が 1, 10, および 20 時間の場合を示す。glucose は緩衝液流だけによつて移動するから, その移動距離は塗布位置における緩衝液流の大きさを示している。さらに Fig. 3 および Fig. 4 は glucose の塗布位置 (沔紙の長軸方向) を x 軸にとり, それぞれの移動距離を y 軸 (ただし glucose の陰極方向の移動を⊕とする) 上に plot した図である。この場合の泳動時間は 1, 3, 5, 10, 15, 20 および 25 時間である。Fig. 3 で電圧 200V, 泳動時間, 1, 3, 5 時間の場合, 沔紙

Fig. 1 Glucose Spots Applied to Different Points on the Horizontal Portion of Paper

Black dots: glucose spots before electrophoresis. Other signs: glucose spots displaced by the buffer flow.

Fig. 2 Glucose Spots Applied to Different Points on the Horizontal Portion of Paper

Black dots: glucose spots before electrophoresis. Other signs: glucose spots displaced by the buffer flow.

Fig. 3 Displacement of Glucose Spots by the Flow of Buffer Solution

The lines with letter show the displacement of glucose spots, the dimensions of which are measured from the corresponding base lines with suffixed letter. The original positions of glucose spots are plotted along the abscissa.

Fig. 4 Displacement of Glucose Spots by the Flow of Buffer Solution

The lines with letter show the displacement of glucose spots, the dimensions of which are measured from the corresponding base lines with suffixed letter. The original positions of glucose spots are plotted along the abscissa.

水平部陰極端から 5.5cm 以上陽極側での glucose の移動距離すなわち緩衝液流は陰極方向に向かい、かつその大きさはほぼ同程度であつた。しかし泳動時間が 10 時間以上の場合には、汙紙面の陽極側程緩衝液流は大きく、かつ汙紙水平部陰極側からの距離に比例してほぼ直線的に増大している。緩衝液流の大きさは汙紙水平部陰極側程小さいが、泳動時間が 1 および 10 時間の場合以外の緩衝液流の平衡点 (glucose 移動距離と x 軸との交点) は汙紙水平部陰極端から 3.5 cm 内の所 (すなわち glucose 移動距離線の延長と x 軸との交点) にあると推定される。400V の場合 (Fig. 4) は泳動時間に関係なく glucose の移動距離線の延長と x 軸との交点) にあると推定される。400V の場合 (Fig. 4) は泳動時間に関係なく glucose の移動距離は汙紙水平部陰極端からの距離に比例して陽極側程大きい (直線関係)。汙紙面上の緩衝液流の平衡点は水平部陰極端から 3.5~6.5 cm 移動する。また同一泳動時間の場合の glucose 移動直線の勾配は 200V の時より 400V の時の方が大きく、緩衝液流が大きいことがわかる。

2. 泳動後に乾熱した汙紙の透電率の変化

汙紙面上のイオン強度の変化を知る目的で泳動後、汙紙を乾熱しその透電率の変化を高周波パピログラフイー³²⁾³³⁾によつて検索した。すなわち、前記の実験で緩衝液流の観察に用いた汙紙を乾熱した後、中央部から巾 2cm×25.5cm の汙紙を切り抜き、13.5 M.C. の高周波を用いて汙紙上の透電率の変化を測定した。予備実験で汙紙上に Veronal および Veronl Na が存在する部分では汙紙の透電率が減少し、かつこれらの電解質の存在量と透電率の減少とはほぼ比例することが知られた。200V では汙紙陰極側ほど透電率は減少していた (Fig. 5)。400V では汙紙中央部を越えて陰極側に行くに従つて透電率は減少し、その peak は大体その泳動条件における緩衝液流の平衡点の位置に一致することが知られた (Fig. 6)。いずれの場合も泳動時間が長い程透電率の変化は大きかった。Fig. 7 は、前項の実験と同じ位置に glucose を塗布したのち、泳動装置のふたをとつて 24 時間、室温 (10°C) に放置した場合の glucose スポットの移動位置および乾熱後の汙紙の透電率の変化を示す。glucose スポットははじめの汙紙上の塗布位置に関係なく汙紙中央紙上に集中している。また透電率の減少も汙紙中央部で最も大きく、汙紙中央線から左右対称に増加して

Fig. 5 Change of "Conductivity" of Dried Paper Detected by High-Frequency Papyrography at 200V (Constant Voltage)

Conductivities of high frequency current, inversely related to the amounts of accumulated electrolytes, are plotted along the ordinate, in arbitrary units. The abscissa indicates the distance of glucose spots from the cathodic end of the horizontal portion of paper.

Fig. 6 Change of "Conductivity" of Dried Paper Detected by High-Frequency Papyrography at 400V (Constant Voltage)

Conductivities of high frequency current, inversely related to the amounts of accumulated electrolytes, are plotted along the ordinate, in arbitrary units. The abscissa indicates the distance of glucose spots from the cathodic end of the horizontal portion of paper.

Fig. 7 Under Free Evaporation

In (A) glucose spots applied to various position on a paper, come together on the middle line of the horizontal portion of paper. (B) shows detected by the changed conductivities of high frequency current,

いるのが認められた。同時に汙紙中央線を中心として Veronal および Veronal Na の結晶が折出しているのが認められた。

3. 汙紙面上の蒸発と泳動像との関係

汙紙面上の緩衝液の蒸発に因っておこる汙紙面上の緩衝液流およびイオン強度の変化は、当然泳動に重要な影響を及ぼす。つぎにこの問題について検討を加えた。

(1) B. P. B. で染色された Albumin (略記: Alb) の泳動様式

汙紙水平部陰極端から 2 cm の所に B. P. B. 加血清を塗布し(血清量 0.01ml/2cm) B. P. B. で染色された Alb の泳動距離を 5 分間隔で測定した。(Fig. 8)。Alb の泳動速度は一般に加電圧の上昇と共に大きくなる。しかし同一電圧における Alb の泳動速度は一般的にいえば一定ではなく、泳動時間の経過とともに異なってくる。この傾向は既に 100V および 200V の時にみられ、さらに 300V および 400V の場合には Alb の泳動距離-時間関係は汙紙中央部付近で凸な逆 S 字型曲線を示している。すなわち、汙紙水平部陰極端から約 8 cm から Alb の泳動速度は次第に減少し始め、ついで最低値を示したのち約 20cm 位から再び早くなつて行くのが観察された。これは汙紙中央部付近では Alb の泳動速度が減少することを示している。同時に測定した電流値の変化 (Fig. 9) をみると、Al の泳動距離-時間関係は近似的に直線的であつた。100V の場合を除いて、加電圧と共に、通電量も次第に増加して行くのが観察された。これは加電圧および泳動時間の増加と共に汙紙面上の電気抵抗が減少することを示している。

(2) 緩衝液流による泳動像の乱れ

15.5cm×37.5cmの大きさの汙紙(T. R. No. 51)の汙紙水平部陰極端からそれぞれ 3.0, 5.5, 9.0, 12.6, 16.5, 20.0 および 22.5cm のところに血清 0.005ml および 20% glucose 0.005ml を隣接して塗布したのち 200V, 7 時間泳動を行なつた。泳動終了後汙紙を乾熱し, glucose の泳動位置に印をつけたのち AS 染色も行なつた (Fig. 10)。また Fig. 11 は汙紙水平部陰極端から 2.0 cm の所から 1 cm 間隔で血清 0.003ml を塗布し, 200V で 10 時間泳動した時の泳動像を示す。Fig. 11 の glucose スポットが示すように、緩衝液流の平衡点は水平部陰極端から 3.5 cm のところにあり、ここから汙紙陽極側に行くほど緩衝液流による試料の移動は大きくなり、分画帯が全体とし

Fig. 8 Time-Migration Distance Relationship for B. P. B. Stained Albumin in Serum and Shape of Albumin Zone

Shaded and stipled areas indicate the zones of BPB stained Alb. The upper solid lines of each Alb zone show the migration distance measured ahead and the lower ones, the migration of tailed Alb zones

Fig. 9 Change of Amperage during Electrophoresis at Constant Voltage Operation

Fig. 10 Electrophoretic Patterns of Serum Protein and Application Points of Serum on Paper

The zones on the anodic part of paper are diffused and blurred.

て試料塗布位置から陽極側へ逆流することによって移動度の遅い γ -gl と glucose スポットとの相互の位置関係は試料塗布位置に関係なくほぼ同様である。

つぎに試料塗布位置が異った場合の泳動像を比較すると (Fig. 11), 試料塗布位置が 汭紙水平部中央付近から, より陽極側に移動するにつれて泳動像はハケで刷いたように次第に不鮮明となっている。同様に Fig. 10 の場合でも試料塗布位置が 汭紙水平部陰極端から 9.0 cm までの場合の泳動像は鮮明であるにもかかわらず, 12.5 cm 以上の場合にとくに Alb 帯が不鮮明である。

4. 汭紙乾熱時の試料の移動

泳動像の観察は泳動終了後汭紙を乾熱し蛋白を固定, 染色してから行なう。汭紙を乾熱する場合にも汭紙面からの緩衝液の蒸発に伴って起こる緩衝液流によって試料の移動がおこる。つぎに乾燥条件による試料の移動について検討した。すなわち, T. R. No. 51 を用い, 汭紙水平部 15.5 cm $\times$ 37.5 cm の短軸方向から各々 2 cm 間隔の平行線を引き, この線上で汭紙長軸 (泳動方向) 端からそれぞれ 1, 3, 5, 9, 11, 13 cm の所に印をしたものを作り, V. V. Na 緩衝液で濡らしたのち汭紙保持枠に装着し, 密閉した泳動装置内に 1 時間静置した。ついで前に印をした位置に B. P. B. 溶液を少量ずつ塗布してから汭紙を取り出し, 汭紙端の緩衝液槽に垂れていた部分を切り取つたのち汭紙を乾燥した。

Fig. 12 (a) は気温 15°C で室内無風所に 3 時間放置

Fig. 11 Electrophoretic Patterns of Serum Protein and the Influence of the Flow of Buffer Solution

Solid lines: application points of serum (0.001ml/1cm) Electrophoresis at constant voltage of 200V, 10hrs, $\mu=0.07$. Electrophoretic patterns show the well separated zones on above one third of paper, which corresponds to the more cathodic part of paper. They are diffused and blurred on beneath one third of paper, which corresponds to the more anodic part of paper.

Fig. 12 Displacement of B. P. B. Spots during Drying

The arrows indicate the displacements of buffer solution from the original positions. The buffer flow in drying enhances with the elongation of electrophoresis hour.

Fig. 13 Displacement of B. P. B. Spots during Drying

The ordinate indicates the displacements of B. P. B. spots from the original positions.

して乾燥させた場合を, さらに(b)は75°C, 30分間加熱乾燥した場合を示す。1) 加熱乾燥するとB. P. B. スポットは汙紙長軸の方向にのみ移動するが, 空气中で自然乾燥させた場合は汙紙長軸(泳動)方向のほか横軸方向にも移動し, 汙紙長軸と斜交して外側へ移動する。2)

加熱乾燥を行なった時, 汙紙の陰極両極端部ではB. P. B. スポットの移動距離は大きい, 汙紙中央部に向かうに従って小さくなり, ついで不動点に移行する。

つぎに乾燥温度とB. P. B. スポットの移動との関係を観察した。Fig. 13(a)にみられるように, T. R. No. 51を用い, 加熱温度を次第に上昇させると, B. P. B. の乾燥時の移動は少なくなる。ことに200°Cの場合, 汙紙の陰陽両端から6 cmより内側の大部分の汙紙水平部分では乾燥によるB. P. B. スポットの移動はほとんど認められなかった。(b)はT. R. No. 51を用いて, 100°C 15分間乾燥した場合である。これらの場合, 乾熱時の試料の移動に一般的な法則は認められなかった。汙紙はT. R. No. 51 A, No. 51, No. 50の順に厚い。(c)に示したように100°C, 15分の乾熱条件ではこの順にB. P. B. スポットの移動は大きい, 各種汙紙の差は予想される程著しくはない。ことに汙紙両極端部におけるB. P. B. の移動の様子, およびB. P. B. の不動点には(b)と同じく法則性は見られなかった。

総括ならびに考按

1. 汙紙面上の緩衝液流とイオン強度の変化について
Closed methodでの泳動は主として汙紙上の電場と電気浸透⁷⁾¹³⁾に規定されているが, open methodでは,

これらの他に泳動中の汙紙面からのJoule熱に基づく緩衝液の蒸発が泳動像に重要な影響を及ぼしている。すなわち, 汙紙面上の蒸発は必然的に汙紙面の乾燥傾向を代償する両側の緩衝液槽からの緩衝液流⁷⁾⁹⁾¹¹⁾¹²⁾および汙紙面上の緩衝液濃化, すなわちイオン強度の上昇を伴ない, 泳動像の分離に大きな影響を及ぼしている。また汙紙を乾熱した場合にも汙紙面上の試料の分画の移動を伴なうことが予想される。泳動中の緩衝液流は汙紙上に塗布したglucoseの移動距離によつて表わされると考えてよい。glucoseはV. V. Na. 緩衝液中では複合体をつくらず電荷を帯びないからである。したがってglucoseの移動位置は泳動中に生ずる電気浸透および蒸発に付随する緩衝液槽からの緩衝液流の大きさの代数和を示すものと考えてよい。著者の実験成績から考えると, 緩衝液の蒸発は加電圧が大きく, かつ泳動時間が長いほど強いと考えられるから, 200V, 泳動時間1~3時間の泳動条件の場合には汙紙面上の蒸発効果は比較的少ないために汙紙面上

Fig. 14 Shift of Buffer Solution on the Horizontal Portion of Paper during Electrophoresis At 200V (Constant Voltage)

The arrows show the direction and dimension of the shift of buffer solution from the original position.

Fig. 15 Shift of Buffer Solution on the Horizontal Portion of Paper during Electrophoresis At 400V (Constant Voltage)

The arrows show the direction and dimension of the shift of buffer solution from the original position.

では、電気浸透による緩衝液流の方が大きく、400V、泳動時間3~5時間では蒸発効果に基づく緩衝液流の方が電気浸透によるものより大きいと考えられる。また200Vで10~25時間泳動した場合は上記の中間の型をとるみなしてよい、すなわち、沱紙面上の蒸発効果と電

気浸透効果が大きい場合に glucose 移動曲線は典型的な直線をなし緩衝液流の平衡点も明瞭となると考えられる。蒸発および電気浸透はともに電圧、泳動時間および緩衝液イオン強度に最も強く影響され、さらに沱紙の種類、緊張度、含水量、外気温などによっても若干の変化を受けるものと考えられる。ことに実際に必要な緩衝液流の平衡点の沱紙上の位置は泳動条件によって変化することは注目しなければならない。

沱紙面上の緩衝液の蒸発は上記の緩衝液流の原因となるほかに、沱紙面上の緩衝液の濃化、すなわちイオン強度の上昇を伴うはずである。B. P. B. 加 Alb の泳動距離を観察した実験で、加電圧が大きい場合に泳動時間が長くなると共に通電量が著明に増加して行く事実は、沱紙面上の抵抗が次第に減少していくこと、すなわち沱紙上の電解質量が次第に増加しイオン強度が増加していくことを示すと考えてよい。しかし、実際に、沱紙面上のイオン強度の変化は緩衝液流によって修飾されるために、沱紙面上の位置によって当然イオン強度の変化のおこり方も異なっていると考えるべきではない。さきに Fig. 3 および Fig. 4 で示した実験の場合について glucose の塗布位置からの移動距離を自然の緩衝液流の方向にとつて現わすと Fig. 14 (200V の場合) および Fig. 15 (400V の場合) のようになる。これらの場合の沱紙面上のイオン強度変化はつぎのように考えることができる。すなわち、沱紙面上の glucose 塗布位置にあった緩衝液は泳動中に絶えず蒸発による濃化を受けながら沱紙上を移動するため、泳動終了時に glucose の位置にある緩衝液のイオン強度は glucose を初めに塗布した位置にあったそれより大きくなっているはずである。すなわち緩衝液流の大きい所ではより濃度の低い緩衝液で次々に置きかえられることになる。そこでこの部位におけるイオン強度はより小さく、反対に緩衝液流の小さい所程イオン強度は大きくなる。沱紙面上の緩衝液流は沱紙陰極面上にある緩衝液平衡点に向かって流されるから平衡点のイオン強度が一番大きい。また平衡点から沱紙の陽極方向に向かうに従つて、緩衝液の移動が大きくなるからイオン強度も相対的

に減少し、沱紙の陽極端の部分では緩衝液槽内のイオン強度とはほぼ同じであるとみなしてよい。反対に緩衝液流の平衡点よりも陰極側では緩衝液流が小さいからイオン強度は一般に大きい、平衡点に近いほどさらに大きくなる。Fig. 14, および Fig. 15 をみると、同一電圧では

泳動時間が長いほど、また同一泳動時間では 400V の方が汚紙面上のイオン強度の変化も大きくなることが予想される。また反対に 200V および 400V を用いた場合、泳動時間が短い場合には緩衝液の移動もわずかであるから、上記のような汚紙面上のイオン強度の変化も少なく、汚紙面上ではほぼ同様であるとなしてよいであろう。さらに泳動後の乾熱した汚紙について行つた高周波パピログラフィーによる透電率の変化はそのまま汚紙上の緩衝液成分 (Veronal 及び Veronal Na) の分布状態を示すものと考えてよいのであるから、上記の汚紙面上のイオン強度の変化についての考察を確実に実証したものと考えられる。すなわち、泳動による汚紙上のイオン強度は各泳動条件下の緩衝液流の平衡点の位置で一番大きく、この点を中心として左右ほぼ対称的に減少していく。しかし、平衡点が緩衝液流の性質として紙汚陰極側に偏つて存在するために、実際上は、平衡点より、より陽極側に行くに従つてイオン強度は次第に減少し汚紙陽極端では、緩衝液槽内の緩衝液イオン強度とほぼ同一になつていと推測される。なお汚紙面上のイオン強度の変化は、実験成績の示すように、電圧、泳動時間などの泳動条件のほか、緩衝液イオン強度、外気温、泳動装置の熱学的性質などの影響も当然受けているものと考えなければならない。

2. 泳動像と緩衝液流およびイオン強度と泳動像との関係

井上、高橋³⁴⁾は、Kunkel & Tiselius⁷⁾ に従つてガラス板法を用いて B. P. B. および B. P. B. 加血清¹³⁾の汚紙上の移動を観察し、B. P. B. および B. P. B. で染色された Alb の泳動距離時間との間には汚紙水平部のほとんど全長においてほぼ直線関係が成り立つていたことを明らかにした。しかし、蒸発を伴う泳動装置では、水平法における Grassmann & Hannig⁹⁾、小林²³⁾、香月³⁵⁾、あるいは懸垂法における Durrum¹⁴⁾ の成績が示すように、両法が直線関係を示すのは、電圧が低く、通電時間が短い場合で、かつ泳動距離が短い場合に限られ、一般には直線関係は成立しない。著者の実験成績でも B. P. B. 加 Al の泳動距離-時間曲線は一般に汚紙中央付近で凸な逆 S 字型をとり、汚紙上の位置によつて泳動速度が異つていたことを示している。この現象は、泳動中の汚紙面上のイオン強度の不均一性に基づくものと解釈される。すなわち、前項で述べた様なイオン強度の変化が泳動中の汚紙面上に起つてしているとすると、著者の実験の場合 (Fig. 6) Alb が水平部陰極端から約 8cm~15cm 位まで泳動する時には Alb は次第にイオン強度の大きい汚紙面上を通り、15cm~20cm 位までは次第にイオン強度の減少している汚紙面上を通ることになる。相対的にみて汚

紙上の緩衝液のイオン強度が大きい所では泳動速度は小さくなり、イオン強度が小さい所では大きくなると考えられる。一方、緩衝液流は Al が汚紙の陽極により近い所を通るに従つて大きくなる。すなわち出発線から 15~20cm 位までの所では泳動速度は次第に遅くなり、Al がさらに汚紙の陽極に近い所を通る場合には緩衝液流が大きくなり、したがつてイオン強度が次第に小さくなり、泳動速度は大きくなる。このようにして逆 S 字型の Al の泳動距離-時間曲線が形成されるものと考えられる。電圧が上昇するに従つて汚紙面上のイオン強度の変化もより大きくなるから、泳動速度の遅れ (逆 S 字型の程度) も大きくなり、ついには Al はほとんど泳動しなくなるものと考えられる。このような泳動速度の遅れは緩衝液流の増加だけで説明することはできない。すなわち、Al が水平部陰極端から約 20cm 以上になると緩衝液流は極めて大きくなるにもかかわらず、かえつて泳動速度が大きくなり、泳動開始直後の泳動速度に接近しているからである。この場合には汚紙陽極側では緩衝液流が大きくなり、常に、濃化を受けない緩衝液槽からの緩衝液で補われており、他の汚紙部分よりも相対的にイオン強度が低いためであると解釈しなければならない。さらに試料塗布位置の汚紙水部陰極端からの位置によつて泳動像の状態も変化する。試料塗布位置が汚紙中央部からより陽極側になるほど得られた泳動像の拡散は大きくかつ不鮮明となる。この事実は Fig. 11 および Fig. 12 の場合に著明に認められるが、さらに B. P. B. 結合 Alb (Fig. 8) が汚紙陽極端に近づき泳動速度が早くなると共に Alb 分画の中が次第に広くなつて行くことから知られる。この現象は、すでに述べたようにこの部分の緩衝液流が泳動方向と逆方向でかつ汚紙陰極端ほど大きいこと、およびイオン強度が相対的に低下していることに起因するものと考えられる。さらに試料塗布位置が緩衝液流の平衡点から外れるとともに汚紙への蛋白の吸着 (tailing) の影響が大きくなることも注目される (Fig. 10)。したがつて試料塗布位置が緩衝液流の平衡点よりもより陰極側にある場合には tailing によつて各分画蛋白の吸着は大きく、蛋白量の減少は著しくなり、反対により陰極側にある場合は他の分画の tailing の上に別の分画の泳動像が重なり、その部分の蛋白量は実際よりも多く現われる。いずれの場合も泳動像の観察および定量にとつて明らかに不都合である。したがつて鮮明な泳動像を得ることおよび tailing による泳動像の歪みを除去するためには、各泳動条件における緩衝液流の平衡点に試料を塗布することが必要である。このために Fig. 10 のように予備実験でその泳動条件における glucose の不動点、すなわち緩衝液流の平衡点を決定してから試料を塗布するか、あるいは

Fig. 11のように泳動水平部の陰、陽両極部を横切るように斜線を引き、この線上の適当な位置に試料を塗布して(斜線法¹¹⁾¹²⁾鮮明な泳動像の得られる試料塗布位置を撰択するかのいずれかの方法をとるべきである。とくに V. V. Na 緩衝液以外の緩衝液、例えば Borate 緩衝液などを用いる場合には斜線法が有用である。これは Borate 緩衝液中では carbohydrate (例えば glucose, dextran など)は帯電した複合物を形成するため、緩衝液流の移動を示さないからである。

3. 汙紙乾熱時の泳動像の移動

汙紙上の試料の検出は大部分の場合泳動後汙紙を乾熱してから行なわれる。乾燥でも汙紙面上の蒸発に基づいて試料の位置移動がおこり、泳動像の変形あるいは分離状態の変化がおこる。著者の実験成績によると、空气中で自然乾燥を行なった場合、試料は汙紙の長軸方向のほか、横軸方向にも移動し、その移動方向が不規則となるのに反し、加熱乾燥の場合 (65°C 以上) には試料の移動は汙紙の長軸方向にしかおこらない。しかし乾燥による試料の移動は乾熱温度にも関係し、乾熱温度が高い場合 (200°C: 5 分) には、汙紙が急速に乾燥され汙紙面上に緩衝液流を生ずるとまがないため、試料はほとんど移動しない。しかし、65~100°C, 15 分の乾燥条件では緩衝液流による試料の移動は無視することが出来ない程度である。しかしこの場合でも汙紙水平部で陰陽両端から約 6~8cm 以内の部分での試料の移動は可成り少ないものとみなしてよい。このような意味からも試料塗布位置はあまり汙紙水平部の両端部分は好ましくないといえる。さらに乾熱時の緩衝液流の大ききや緩衝液流の不動点は乾熱温度や時間のほか汙紙の緊張状態、湿潤状態、乾熱操作などの微かな影響を受けるものと考えられ同種汙紙を用いて行なつても毎回若干の変動が認められ一定の規則性がみられなかつた。したがってこの事実からも、汙紙法による厳密な移動度の測定は closed method, open method の如何を問わず困難であるといえる。しかし一枚の汙紙上で隣接して試料を塗布して泳動する場合には、これらの試料の相対的な位置関係、あるいは移動度を比較することは可能であろう。したがって一定の乾燥条件を設定することは蛋白の固定条件を一定にするだけでなく、泳動後の分画の相対的な移動度の比較のためにも必要である。

拙筆にあたって御指導、御校閲をいただいた恩師脇坂行一教授に深甚なる謝意を捧げる。また、汙紙電気泳動法について御教示、御援助を仰ぎ、かつ御校閲を煩した神戸女子薬科大学橋本庸平教授に衷心より深謝する。なお本研究に協力していただいた谷口朱実氏に感謝する。

文 献

- 1) Wieland, T.: *Angew. Chem.*, **62**, 31 (1950)
- 2) Turba, F. & Enenkel, H. J.: *Naturwissenschaften*, **37**, 93 (1950)
- 3) Durrum, E. L.: *J. Am. Chem. Soc.*, **72**, 2943 (1950)
- 4) Cremer, H. & Tiselius, A.: *Biochem. J.*, **8**, 320, 273 (1950)
- 5) Grassmann, W. & Hannig, K.: *Naturwissenschaften*, **37**, 397 (1950)
- 6) McDonald, H. J., Urbin, M. C. & Williamson, M. B.: *Science*, **112**, 227 (1950)
- 7) Kunkel, H. G. & Tiselius, A.: *J. Gen. physiol.*, **35**, 89 (1951)
- 8) Grassmann, W., Hannig, K. & Knedel, M.: *Deut. Med. Wschr.*, **76**, 333 (1951)
- 9) Grassmann, W. Hannig, K.: *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.*, **290**, 1 (1952)
- 10) Grassmann, W. & Hannig, K.: *Klin Wschr.*, **32**, 838 (1954)
- 11) Macheboeuf, M., Rebeyrotte, P., Dubert, G. M. & Bruherie, M.: *Bull. Soc. Chim. Biol.*, **35**, 334 (1953)
- 12) Macheboeuf, M., Dubert, G. M. et Rebeyrotte, P.: *Ibid.*, **35**, 346 (1953)
- 13) Kunkel, H. G.: *Methods Biochem. Analysis*, **1**, 141 (1954)
- 14) Block, R. T., Durrum, E. L. & Zweig, G.: *A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis*, p. 333~409, Academic Press. (New York) 1955,
- 15) McDonald, H. J.: *Ionography, The Yearbook Publisher, Chicago*, 1955.
- 16) Crook, E. M., Harris, H., Hassan, F. & Warren, F. L.: *Biochem. J.*, **56**, 434 (1954)
- 17) Jencks, W. P., Jetton, M. R. & Durrum, E. L.: *Biochem. J.*, **60**, 205 (1944)
- 18) Pieper, J.: *Klin. Wschr.*, **36**, 605 (1958)
- 19) 島尾和男: *生物物理化学*, **5**, 1 (1958)
- 20) 島尾和男: *生物物理化学*, **5**, 41 (1958)
- 21) Ciba Foundation Symposium on Paper Electrophoresis, J. & A. Churchill Ltd. (London) 1956
- 22) 小林茂三郎: *日本医学総会* (昭和 27 年 9 月)
- 23) 小林茂三郎: *生物物理化学*, **2**, 229 (1954)

- 24) 佐野勇：日本医事新報 No. 1531 (昭和 28, 8, 9)
- 25) 宮本璋, 杉本良一他：生物物理化学, **5**, 181 (1956)
- 26) 宮本璋, 杉本良一編：沔紙電氣泳動シンポジウム第1集, 文光堂 (東京) 1958
- 27) Consden, R. & Stanier, W. M.: Nature, **170**, 1069 (1952)
- 28) Flynn, F. V. & de Mayo, P.: Lancet, **261**, 235 (1951)
- 29) 向野栄：内科宝函, **5**, 585 (1958)
- 30) 森五彦：薬学雑誌, **74**, 179 (1954)
- 31) 猪熊孝治, S. Y. Deur, 仲西クキ子, 阿部正和：生物物理化学, **3**, 10 (1956)
- 32) Hashimoto, Y. and Mori, I.: J. Pharm. Soc. Japan, **12**, 1532 (1952)
- 33) Hashimoto, Y. and Mori, I.: Nature, **172**, 542 (1953)
- 34) 井上章, 高橋勝三：生物物理化学, **2**, 268 (1955)
- 35) 香月武人：生物物理化学, **2**, 116 (1955)