人血清蛋白の沔紙電氣泳動法の基礎的研究

II 電氣泳動像の分離と実験条件との関係について、

ことに泳動像のコントロールの問題

京都大学医学部内科第1講座 (指導 脇坂行一教授)

山 口 延 男

Fundamental Studies on Paper Electrophoresis of Human Serum Protein.

II. Some Experimental Conditions Influencing the Separation of Electrophoretic Patterns: The Control of Electrophoretic Separations.

Nobuo Yamaguchi

(1st Division, Department of Internal Medicine, Faculty of

Medicine, Kyoto University, Director; Gyoichi Wakisaka)

1. To make the voltage between both ends of the horizontal portion of paper as equal as possible in each experiment, it is necessary to keep the tensions of paper constant and to maintain the distances from the surface of buffer solution to the horizontal portion of paper constant, too.

2. After electrophoresis, pH-values of barbiturate buffer solution deviate from the original pH, to some extent, in both of the anode and cathode containing vessels. They deviate in the paper ends containing vessels only when the applied voltage is relatively high or/and electrophoresis hour is extremely long. pH-Values of total buffer solutions, however, have little change if they are mixed and dissolved well after electrophoresis. Therefore, the same buffer solution can be used three or four times repeatedly, although some changes of ionic strength and some contaminations with paper fibres and bacilli may occur.

3. At higher voltages, 1) the migration velocities are large, but the electrophoretic patterns are worse separated, especially when electrophoresis hour is short. 2) only in long electrophoresis hours, they are well separated and less blurred in their zones because of the enhancement of ionic strength on paper. 3) the length of Alb developed from γ -gl is short because both of the migration velocities and the buffer flow augment.

4. When the ionic strength of buffer solution is stronger, 1) the migration velocities are small, 2) the electrophoretic patterns are well separated and their zones are less blurred because the zonal diffusion is restricted by the augmented ion transportation. 3) α_1 -gl is well separated from Alb. 4) globulins, especially, γ -gl displace to the more acidic part on paper if the migration distances of BPB stained Alb is fixed to a definite from the application point.

5. The migration distance of BPB stained Alb from the application point is a good index for checking the electrophoretic separation of serum protein, because the electrophoresis hour required for the good separation is not definite but dependent on the experimental temperature and so on.

6. In the author's laboratory, serum protein is submitted to the electrophoretic run usually at the constant voltage of 200V, using sodium barbiturate buffer of pH 8.6 and ionic strength of 0.075. When serum volumes of 0.01ml/2cm (width of a paper strip) or less are applied, BPB stained Alb is allowed to

migrate 8cm from the application points. When serum volumes of 0.02ml or more, BPB stained Alb is allowed to 12cm, likewise. If the electrophoretic patterns are poorly separated and blurred, for example, owing to the relative low temperature, voltage and electrophoresis hour (expressed as the migration distance of BPB stained Al), for the first choice, and next the ionic strength are adjusted so as to ameliorate the results described in 3 and 4.

緒 論

血清蛋白の沝紙電気泳動像の分離には泳動装置の熱学的性質のほかは電気的条件や緩衝液の種類, pH およびイオン強度や実験温度などが関係することが知られている。とくに open method では前報¹⁾で報告したように泳動中に起る蒸発のために, 可成り複雑な緩衝液流やイオン強度の変化が起っている。これらの変化は沝紙面上の泳動像の分離条件の撰択をむづかしくしている。

本報では, 引続き沝紙面上の泳動像の分離条件と諸種の泳動条件および泳動操作との関係について実験的検討を加えた。

実 験 方 法

1. 試料および試料塗布法: 正常人5例から早朝時に採血した血液より血清を分離して用いた。試料塗布には 0.05ml 目盛りのマイクロピペットを使用した。

2. 緩衝液: Veronal Veronal Na 緩衝液 pH 8.6 を用いた。イオン強度は主として $\mu=0.05$ を用い, イオン強度を変えて泳動した場合はその都度記載した。イオン強度の変化は緩衝液成分の濃度を変えて行なった。緩衝液量は毎回 740ml とした。

3. 沝紙: 東洋沝紙 T.R. No. 51 を用いた。沝紙の大きさは 15.5×37.5cm で, あらかじめ緩衝液で濡らしてから沝紙保持枠に装着した。

4. 泳動条件: 定電圧下で通電し電圧値, 電流値および泳動時間は実験により適宜決定した。

5. 電圧の測定: テスターを用いて測定した。

6. 緩衝液 pH の測定: ガラス電極 pH メーター (島津製) を用いて測定した。

泳動装置, 直流発生装置, 泳動操作, 蛋白の染色法などその他の実験方法は既報¹⁾に準じて行なった。

実 験 成 績

1. 泳動装置回路内の電圧低下

直流発生装置の電圧示度と泳動時の実効電圧との関係および沝紙面上の電圧分布について検討を加えた。15.5×37.5cm の大きさの沝紙 (T.R. No. 51) を沝紙枠に装着して2時間平衡を保たせたのち, 定電圧の条件下で順次加電圧を行ない, テスターを用いてそれぞれ直流発生装置陰陽両端子間, 白金電極槽間, 沝紙端を入れた緩衝

液槽 (以下沝紙槽とよぶ) 間, および沝紙水部陰陽両極端間の電位差を測定した (Fig. 1)。V. V. Na の緩衝液のイオン強度は $\mu=0.05$ である。

両電極槽間の電位差は直流発生装置両端子間の電位差より約2~3V低下していた。両極沝紙槽間の電位差は電源の加電圧とはほぼ比例して大きくなったが, その勾配は電源のそれよりも少しゆるかった。

また沝紙水平部両極間の電位差の変化は, 電源の加電圧とは平行せず, 電源電圧の変化の度合いよりも小さい。したがって沝紙上の試料に働く電気力は電源の加電圧とは平行しないことが注目される。陰陽両極間の電位差は2回の実験成績では各条件下で約15~30V の差が認められた (Fig. 1 の D, D')。

つぎに直流発生装置示度 200V の場合について沝紙面上の電位差を測定した (Fig. 2)。沝紙槽間の電位差が 165V であるのに対して, 沝紙水平部両極間の電位差は 116~118V である。沝紙面上の泳動方向と直交する方向

Fig. 1 Voltage Drop in a Circuit of Electrophoresis Apparatus

A: Voltage read from the stabilizer, B: Voltage between the cathodic and anodic buffer vessels containing platinum electrode, C: Voltage between the cathodic and anodic buffer vessels containing paper ends, D, D': Voltage between the cathodic and anodic ends of the horizontal portion of paper (Sodium barbiturate buffer, pH 8.6, $\mu=0.05$ Paper: T.R. No. 51)

Fig. 2 Voltage Drop on the Horizontal Portion of Paper at 200V (read from Stabilizer)

(V. V. Na Buffer, pH 8.6, $\mu=0.05$)

(1) AA': 195V

BB': 163V

(2) C₁C₁: 116V C₁E₁: 13V E₁F₁: 24V

C₅D₄: 118V E₂E₂: 13V E₂F₂: 24V

C₇D₇: 117V C₃E₃: 12V E₃F₃: 24V

C₄E₄: 13V E₄F₄: 24V

C₅E₅: 13V E₅F₅: 24V

C₆E₆: 13V E₆F₆: 25V

C₇E₇: 13V E₇F₇: 25V

(3) C₁C₇: 0V

D₁D₇: 0V

には電位差は証明されなかった。さらに沱紙面上陰極端から 5 cm の所 (試料塗布点) および 13cm の所 (泳動終了点) における電位差は、沱紙水平部陰極端からそれぞれ 12~13V, および 24~25V であった。すなわち、沱紙水平部においては泳動方向にのみ電場が認められた。

また同一沱紙槽内および同一電極槽内においても横軸方向の電位差は検出されなかったが、陰極槽で分極の結果高度の Veronal が折出を伴う場合には白金電極付近では陽極槽の他の部に比べて 2~3 V の電圧低下がみられた。しかしこの場合でもブリッジを隔てた沱紙槽内の各点は同一電位であることが示された。

2. 電圧と蛋白分画の分離度および鮮明度との関係

泳動時の電圧と泳動像の分離度および鮮明度との関係を知るために電源電圧をそれぞれ 100V, 200V, 300V および 400V とした場合の泳動像について観察した (Fig. 3, 4, 5, 6)。V. V. Na 緩衝液のイオン強度は $\mu=0.05$ とした。血清塗布量は 0.01ml/2cm (沱紙巾) とし、これらを沱紙水平部陰極端から 5 cm の所に塗布し、各々の電圧条件で試料塗布点からそれぞれ 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14cm まで達した時に泳動を終了し固定および染色を行なった。その結果次のことが観察された。

1) 良好な泳動像が得られるのは、100V では Alb の移動距離が塗布位置から 8 cm 以上の場合、200V および 300V では 10cm 以上の場合、400V では 12cm 以上の場合であった。これらの場合の泳動時間 (Table. 1 お

Fig. 3 Electrophoretic Patterns of Serum Protein at 100V (Constant Voltage)

Migration distances of B. P. B. stained Alb are, from above, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14cm, respectively. Normal serum of 0.01ml is applied to 2cm width before electrophoresis.

Fig. 4 Electrophoretic Patterns of Serum Proteins at 200V (Constant Voltage)

Migration distances of B. P. B. stained Alb are, from above, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14cm, respectively. Normal serum of 0.01ml weisre applied to 2cm width before electrophoresis.

および Fig. 7) はそれぞれ 11 時間 40 分, 8 時間 15 分, 5 時間 43 分, 5 時間 30 分であった。一般に電圧

Fig. 5 Electrophoretic Patterns of Serum Proteins at 300V (Constant Voltage)

Migration distances of B. P. B. stained Alb are, from above, 2, 4, 6, 8, 10 and 12cm, respectively. Normal serum of 0.01ml is applied to 2cm width before electrophoresis.

Fig. 6 Electrophoretic Patterns of Serum Proteins at 400V (Constant Voltage)

Migration distances of B. P. B. stained Alb are, from above, 2, 4, 6, 8, 10, 12 and 14cm, respectively. Normal serum of 0.01ml is applied to 2cm width before electrophoresis.

Table 1 Condition of Electrophoresis of Serum Protein at Constant Voltage Operation

Voltage	Mig. Distance of Al	Date	Amperage (mA)		Electrophoresis Hours
			at Beginning	at End	
100V	2cm	29/12	1.6	1.7	3.30
100	4	22/11	1.6	1.7	5.50
100	6	19/11	1.7	1.9	9.00
100	8	21/11	1.7	1.8	11.40
100	10	21/11	1.7	1.8	15.00
100	12	—	—	—	—
100	14	—	—	—	—
200V	2cm	29/12	2.8	2.8	1.50
200	4	23/11	2.8	3.0	3.00
200	6	22/11	2.8	3.1	4.30
200	8	15/11	2.9	3.3	5.50
200	10	19/11	3.0	3.5	7.45
200	12	16/11	2.8	3.4	11.00
200	14	17/11	3.0	3.4	13.45
300V	2cm	19/12	4.8	5.1	2.00
300	4	19/12	5.0	5.8	3.00
300	6	17/12	4.7	6.1	3.50
300	8	17/12	4.9	6.3	4.57
300	10	19/12	4.9	6.6	5.43
300	12	18/12	4.8	7.2	7.00
300	14	20/12	5.0	8.0	9.25
400V	2cm	21/12	6.6	7.4	45
400	4	21/12	6.6	7.6	1.10
400	6	22/12	6.6	7.8	2.05
400	8	22/12	6.0	7.3	2.50
400	10	19/12	6.1	8.3	3.30
400	12	22/12	5.7	8.4	5.30
400	14	22/12	6.0	9.6	7.15

Fig. 7 Time Required for Migration of Serum Albumin at Constant Voltage

Change of Amperage under the above Illustrated Condition of Electrophoresis

が高くなるに従って分離像が完成されるまでの時間は短かいことが知られた。2) Alb の同一泳動距離、例えば 8 cm の場合の分離度の変化をみると、100V ではほぼ分離は完了しているのに、200V 以上ではなお分離は不十分で、とくに 300V, 400V では、さらに不良であった。しかし、3) 泳動距離が十分に大きい場合、すなわち 12cm 或いは 14cm の場合は、300V, 400V でもよく分離した。分離した分画像の鮮明度は、300V, 400V で Alb の泳動距離が 12cm, 14cm の場合の方が良好で、100V, 200V で Alb の泳動距離が 10cm, 12cm, 14cm の場合の方がかえって悪かった。4) 100V および 200V では泳動中の緩衝液流による γ -gl 部の塗布点からの移動はほとんどみられないにもかかわらず、300V で泳動距離 10cm, 12cm の場合、400V で泳動距離 6cm 以上の場合には γ -gl の塗布点からの移動は次第に大きくなった。したがって Alb と γ -gl 間の展開距離は Alb の同一泳動距離における 100V の場合よりも著しく短縮し、分離した泳動像自体が緩衝液流に押し流されて、圧縮されたような外観を示した。5) 各電圧下 (ただし定電圧) での通電中の電流値 (Fig. 7) は電圧の大きさおよび通電時間の長さに従って大きくなるのが認められた。

3. 泳動条件の変化と緩衝液の pH との関係

V. V. Na 緩衝液 $\mu=0.05$, 740ml を緩衝液槽 4 ケに分配した。白金電極を挿入した電極槽 (全容量 ca. 210cm³) 2 ケ、および汚紙端を浸した紙汚槽 (全容量 ca. 280cm³) 2 ケを用い、これらには総量 740ml の V. V. Na 緩衝液 $\mu=0.05$ を分配した。陰極陽極の電極槽 (汚紙槽は緩衝液をみたしたガラスブリッジで連結した。汚紙は T.R. Na. 51, 155×37.5cm を用いた。泳動前の緩衝液 pH は 8.58~8.60 で泳動終了後の各緩衝液槽の pH およびこれらの全緩衝液を混合したもの (その際 $\oplus$ 極に Veronal の折出があれば溶解後) の pH を Table 2 に示した。100V および 200V の各泳動時間における泳動後の全緩衝液の混合後の pH は 8.51~8.60 で著しい変化は認められなかった。しかし、泳動時間が長いほど少し酸性側に偏る傾向が認められた。なお泳動中の蒸発および緩衝液を移す際の緩衝液の損失は 10~30ml であった。2) 泳動終了直後の電極槽の pH の変化は、陽極側では少し酸性に傾き、その程度は泳動時間の延長および加電圧の増加と共に大きくなる。陰極側の緩衝液槽内の緩衝液の pH は反対にアルカリ性に傾き、その程度は泳動時間の延長および加電圧の増加と共に著しくなっていた。3) 一方汚紙槽内緩衝液の pH は両極共に泳動条件の変化が大きい場合でもかなり一定に保たれていた。ただし 300V, 7 時間および 400V, 5 時間の場合では陽極側汚紙槽緩衝液の pH はそれぞれ 8.50, および 8.48, 陰極側汚紙槽緩衝液の pH はそれぞれ 8.65 および 8.62 であった。したがってこのような泳動条件においては汚紙槽内の緩衝液の緩衝作用が十分でないことは注意を要する。

4. 緩衝液イオン強度と泳動像の分離との関係

V. V. Na 緩衝液のイオン強度を変えて $\mu=0.03$, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.075, 0.08 および 0.09 とし、それぞれの場合の泳動像について観察した。泳動は定電圧 200V で行ない、B. P. B. と結合 Alb が塗布点から 8cm および 12cm 泳動した時泳動を終了し、固定、染色を行なった。その結果次のことが知られた。1) 血清量 0.01ml/2cm の場合、泳動距離が 8cm (Fig. 8) では $\mu=0.05\sim0.06$ で Alb, α_2 -gl, β -gl, γ -gl が分離し、 $\mu=0.07$ 以上ではさらに Alb と α_1 -gl が分離した。イオン強度が上昇すると共に泳動像も鮮明になった。泳動距離が 12cm 場合 (Fig. 9) では、 $\mu=0.03$ で既に Alb, α_2 -gl, β -gl, γ -gl に分離し、泳動像も次第に鮮明となった。2) 血清量 0.03ml/2cm 場合、泳動距離 8cm (Fig. 10) では泳動像の分離度は著しく悪いが $\mu=0.075$ 以上の場合には泳動像も鮮明となった。泳動距離が 12cm の場合 (Fig. 11) には $\mu=0.04$ で Alb, α_2 -gl, β -gl, γ -gl に分離したが鮮明度はなお不良であった。 $\mu=0.07$ および 0.075 以上では Alb と α_1 -gl が

Fig. 8 Electrophoretic Patterns of Serum Protein with Relation to Ionic Strength of Buffer Solution

Ionic strength of barbiturate buffer solution, from above, 0.05, 0.06, 0.07, 0.075, 0.08 and 0.09, respectively. Serum volume: 0.01ml/2cm, Migration distance of Alb: 8cm, Voltage: 200V.

Fig. 10 Electrophoretic Patterns of Serum Protein with Relation to Ionic Strength of Buffer Solution

Ionic strength of barbiturate buffer solution, from above, 0.05, 0.06, 0.07, 0.075, 0.08, and 0.09, respectively. Serum Volume: 0.03ml/2cm, Migration distance of Alb: 8cm, Voltage: 200V.

Fig. 9 Electrophoretic Patterns of Serum Protein with Relation to Ionic Strength of Buffer Solution

Ionic strength of barbiturate buffer solution, from above, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, and 0.09, respectively. Serum Volume: 0.01ml/2cm, Migration distance of Alb: 12cm, Voltage: 200V.

Fig. 11 Electrophoretic Patterns of Serum Protein with Relation to Ionic Strength of Buffer Solution

Ionic strength of barbiturate buffer solution from above, 0.03, 0.04, 0.05, 0.06, 0.07, 0.08, and 0.09, respectively. Serum volume: 0.03ml/2cm, Migration distance of Alb 12cm, Voltage: 200V.

Fig. 12 Condition of Electrophoresis of Serum Protein with Relation to Ionic Strength of Buffer Solution at 200V (Constant Voltage)

Migration distance at Alb.

Fig. 13 Separation of Serum Protein Fractions with Relation to Ionic Strength of Buffer Solution at 200V (Constant Voltage)

Migration distance of Alb: 8cm

Fig. 14 Separation of Serum Protein Fractions with Relation to Ionic Strength of Buffer Solution at 200V (Constant Voltage)

Migration distance of Alb: 12cm

Table 2 pH Change of Buffer Solution Before and After Electrophoresis

Voltage	Time for Electro-phoresis	pH						Volume of Buffer Solution (ml)	
		before Electro-phoresis	after Electrophoresis					before Eelectro-phoresis	after Electro-phoresis
			Vessel of Anode	Vessel of Paper		Vessel of Cathode	Mixed		
				Anodic	Cathodic				
100	6	8.60	8.58	8.60	8.60	8.66	8.60	740	728
100	9	8.58	8.50	8.58	8.59	8.80	8.58	740	728
100	12	8.58	8.30	8.60	8.54	8.82	8.60	740	727
100	15	8.58	8.38	8.60	8.60	8.83	8.52	740	736
200	4.5	8.60	8.50	8.60	8.60	8.70	8.60	740	732
200	8.3	8.58	8.35	8.58	8.60	8.78	8.60	740	715
200	11	8.58	8.42	8.60	8.60	8.80	8.55	740	711
200	14	8.58	8.20	8.58	8.51	8.82	8.51	740	720
300	7	8.60	8.20	8.50	8.65	9.05	8.55	740	720
400	5	8.60	8.10	8.48	8.62	11.08	8.51	740	722

Table 3 Conditions of Electrophoresis of Serum Protein with Relation to Ionic Strength of Buffer Solution

Ionic Strength	Migration distance of Alb: 8cm				Migration distance of Alb: 12cm			
	Date	Amperage (mA)		Hours	Date	Amperage (mA)		Hours
		at Beginning	at End			at Beginning	at end	
0.03	24/10	2.2	2.3	6°08'	23/10	2.4	2.3	11°22'
0.05	24/11	3.0	3.0	6°25'	23/10	3.0	3.5	10°48'
0.06	24/10	3.8	4.0	6°18'	—	—	—	—
0.07	24/10	3.8	4.4	6°12'	23/10	4.3	5.3	11°33'
0.75	24/10	4.4	5.4	6°21'	—	—	—	—
0.08	24/10	4.7	6.0	6°35'	—	—	—	—
0.09	24/10	5.0	6.2	7°02'	23/13	5.8	7.8	12°25'
0.07NaCl	26/10	5.8	6.6	6°02'	—	—	—	—
0.09NaCl	26/10	8.0	10.0	3°50'	—	—	—	—

分離すると共に泳動像の鮮明度も好転を示した。3) これらの場合の泳動条件の変化 (Table 3, Fig. 12) をみると緩衝液イオン強度の上昇と共に定電圧条件で電流値は大きくなり、かつ泳動前後の電流値の変化も大きい。また電流値の変化は同一イオン強度の場合泳動距離が長い方が大きい。しかし、Alb が塗布位置から 8cm または 12cm 泳動するに要する時間はイオン強度の増加と共に少し延長する傾向を認めた。泳動距離 8cm の場合 (Fig. 8, 10) には、イオン強度の上昇と共に γ -gl は試料塗布点より陽極側に泳動し、泳動距離 12cm の場合 (Fig. 9, 11) は、 $\mu = 0.03$ および 0.04 では γ -gl は反対に陰極側に移動した。4) Alb $\sim\gamma$ -gl の展開距離はイオン強度が大きくなると共に短縮した (Fig. 13, 14)。

総括ならびに考按

I 電気的条件と泳動像との関係

1. 泳動に關係する実効電圧の問題

泳動条件としての電圧値あるいは電流値は通常直流発生装置の示度で示されることが多い。しかし厳密には、汙紙端間あるいは汙紙水平部間の電圧、電流値が泳動に關係する。すなわち一定電圧を用いても緩衝液槽内の汙紙の長さ、汙紙水平部の長さ、および汙紙水平部端から緩衝液面までの汙紙の長さなどによって当然泳動に關係する実効電圧値は異なってくるはずである。著者の成績でも、電極槽と汙紙槽との間、および汙紙槽と汙紙水平部陰極端との間の電圧低下が大きいことが知られた。殊に前者は電源加電圧によってあまり変化はみられなか

ったが、後者は加電圧が大きくなる程著明になることが知られた。小林、村井²⁾が汙紙水平部と緩衝液面間の距離に泳動像の分離状態が支配されることを指摘し、この距離が大きい場合には Alb と $\alpha_1\text{-gl}$ との分離がよいことを述べている。この場合の分離度の変化は当然上記のような汙紙上の実効電圧の変化に関係しているものと考えられる。この様な成績から著者は毎回 740ml の緩衝液を使用し汙紙水平部と緩衝液面までの距離を 3.5cm になるようにしている(汙紙水平部の長さは 25.5cm)。また、電極槽内では白金電極のある所とない所との間では数Vの電位差がみられたが、ブリッジを隔てた(汙紙槽内)では電位差は証明されなかつた。これは電極槽を分けた方が好都合であることを示すと共に、汙紙という巨大な抵抗が介在する場合には、緩衝液槽内の電位差は無視出来る程度であると結論してよい。

汙紙水平部端間の電位差は2回の実験で異なっていた。これは汙紙装着の場合に汙紙抵抗が変化していることを示すもので、汙紙の種類、含水量、緊張度などに関係するものと考えられる³⁾。しかし汙紙面の横軸方向には電位差は認められなかつた。したがって泳動像の歪みの原因となる泳動中の電場の歪みは汙紙装着時の汙紙の緊張度の不整あるいは繊維走行の捩れなどに基づく泳動中の蒸発やイオン強度の変化などに因るものと考えられる。これらの問題については次報³⁾で報告する。

2. 電源加電圧と泳動像との関係

一般に血清蛋白の汙紙電気泳動では低電圧低電流が用いられている。これは既述のように、この条件下では泳動距離と泳動時間が近似的に直線関係を示すこと⁴⁾⁵⁾⁶⁾、および Joule 熱の発生が少ないことによる。しかし、高圧汙紙電気泳動の場合は除外しても、Holt⁷⁾のごとくかなりの高圧を用い短時間泳動(350V, 2時間)の利点を主張する人もある。open methodでの泳動距離—時間関係は本質的に直線関係をもたない¹⁾のであるから泳動像の分離状態のみに着目して泳動像と電圧との関係を検討することも必要であろう。一般に加電圧は汙紙上の電場を強めるのであるから帯電電体粒子の移動度の差すなわち各分画の分離度は良くなると予想される。しかし、著者の実験事実はこれに反し、加電圧が大きい場合には、泳動時間は短くなるが分離状態(分離度および鮮明度)はかえって不良となつた。泳動時間が相対的に長い場合(泳動距離が長い場合)に分離が良くなるのはむしろ泳動中の汙紙面からの緩衝液の蒸発によつて生ずるイオン強度の増加¹⁾を介するものと考えられる。したがって open methodの場合加電圧の増加は泳動像の分離状態にはあまり関係をもたず、汙紙上のイオン強度の変化と相まつて分離度を良好にするものと考えられる。

II 緩衝液条件と泳動像との関係

電気泳動における緩衝液としては、試料ができるだけ多数の成分に分離し、かつ泳動像の再現性が良いものを必要とする。すでに Longsworth⁸⁾は Tiselius 法の場合に Verona Na 緩衝液が他の緩衝液より秀れていることを報告し、汙紙電気泳動法でも Veronal 緩衝液 pH 8.6⁹⁾、Veronal Na acetate 緩衝液 pH 8.6⁴⁾などが主として用いられている。向野¹⁰⁾も Veronal Na を含む緩衝液を用いると分画帯の拡散が少ないことを報告し、小島¹¹⁾も分離精度の良いことおよび泳動速度が早いことから V. V. Na 緩衝液が Phosphate 緩衝液に優ることを報告している。著者はさらに V. V. Na 緩衝液を用いて泳動した場合、緩衝液の pH およびイオン強度の変化と泳動像との関係について検討を加えた。

1. 諸種の液動条件下における泳動前後の V. V. Na 緩衝液の pH の変化について

電極槽内の緩衝液では、泳動時の電圧および泳動時間の長さのいずれか、または両者に比例して陰極側では、次第にアルカリ性に、陽極側では次第に酸性に移行して行く傾向が明瞭に指摘出来た。これは通電による V. V. Na 緩衝液の電気分解の進行に左右されていることは明白である。しかし、電極槽とブリッジで連結されている汙紙槽内の緩衝液の pH の変化は、電極槽内の pH の変化よりも著しく緩和されており、極端な泳動条件の場合を除いては一般に泳動による変化はほとんど見られないことを知つた。したがって通常の泳動条件では、緩衝液槽と電極槽とを区別して使用する限り、緩衝液の pH の変化は汙紙面上の泳動像には影響を与えないと考えられる。また、緩衝能は当然液量に関係するから、通常の泳動条件では著者の用いた緩衝液量 740ml で充分であることがわかる。Kunkel¹²⁾はガラス板法で, barbital 緩衝液 pH 8.6, $\mu=0.1$ を用いて 24 時間泳動する場合の緩衝液量を理論的に 313ml と計算し、実際の泳動で 800ml を用いた場合、緩衝液の pH の変化はみられなかつたことを報告している。

泳動後混合した緩衝液の pH は通常の泳動条件ではほとんど変化しないことが知られたので、緩衝液の回収を慎重に行なえば同一緩衝液は 2~3 回繰り返して使用できると考えられる。香月¹³⁾、畑下¹⁴⁾らも同一緩衝液を 4~5 回使用して泳動を行なつても泳動像および血清蛋白分画定量値にはほとんど影響しないことを報告している。勿論厳密には、泳動後の混合緩衝液の pH の変化がみられなくても、前の泳動による緩衝液の蒸発、濃化や泳動速動の早い血清中の低分子イオンの混入などによつてイオン強度の増加がおこり、次の泳動像や泳動条件に若干の変化を与えること、あるいは細菌類による緩衝

液の汚染が予想される。したがって厳密な実験には当然新しい緩衝液を使用するべきであろう。なお香月¹³⁾が緩衝液の使用回数が増えると共に Alb と γ -gl との間の展開距離が短縮する傾向があることを指摘しているが、これは次項で論ずるように緩衝液のイオン強度の上昇に基づくものと考えられる。

2. 緩衝液イオン強度と泳動像の分離状態との関係について

血清蛋白の分離状態すなわち、その分離度および鮮明度は緩衝液のイオン強度と密接な関係があることが知られた。一般に緩衝液のイオン強度が増加すると共に泳動像の分離度および鮮明度は共に良好となつて行く傾向が認められた。これはイオン強度の増加が汚紙面上の蒸発を促し、汚紙面上の緩衝液濃度すなわちイオン濃度を増加させ、各分画の拡散を防ぐように作用するためと考えられる。Franglen¹⁵⁾も緩衝液のイオン強度が大きい場合には泳動像が tight (緊密) となることを指摘し、宮本、中川¹⁶⁾らは、これが蛋白粒子に衝突するイオン流の増加に基づくものと考えている。Ressler et al.¹⁷⁾¹⁸⁾は緩衝液のイオン強度が低下すると、 α_1 -gl、 α_2 -gl の相対的移動度が大きくなり特に Alb と α_1 -gl とは合一し、 β -gl、 β_1 -gl と β_2 -gl に分離し反対にイオン強度が高いと γ -gl は 2 つに別れる可能性がある事を報告している。著者の成績からも Alb と α_1 -gl との分離はイオン強度の大きい方が良好であるのに反して、 β -gl と γ -gl との分離はむしろ低イオン強度の方が良いことが知られる。さらに Durrum¹⁹⁾も同様に V. V. Na 緩衝液を用いた場合、Alb、 α_1 -gl、 α_2 -gl の分離には $\mu=0.075$ がよいが、 β -gl と γ -gl の分離には $\mu=0.05$ の方がよいと述べている。しかしイオン強度の小さい場合には同時に泳動像の鮮明度がよくないことおよび泳動像、ことに γ -gl の陰極側への移動が大きくなることを指摘しなければならない。すなわち著者の実験成績で Alb の泳動距離が同一の場合の泳動像を比較すると、イオン強度の大きい場合には、泳動像の分離状態が良好になると共に、Alb と γ -gl との間の展開距離はかえって短縮する傾向が認められる。これは緩衝液のイオン強度の増加と共に、通電量が大きくなり、汚紙面上の蒸発が大きくなり、蒸発に基づく緩衝液流の移動効果が電気浸透によるものより大きくなるためと考えられる。反対にイオン強度の低い場合は蒸発による緩衝液流よりも電気浸透による緩衝液流の方が大きくなり、 γ -gl の陰極方向への移動を大きくするものと考えられる。このような事実からも、試料塗布位置は泳動条件に応じて決定しなければならないことが了解される。また同一イオン強度の場合に泳動距離だけを延長すると (8 cm→12cm)、泳動像の鮮明度はやや減少する

が分離度は著しく改善されている。血清塗布量が多いと各分画の拡散が大きくなり、分離度および鮮明度は低下するが、この場合でも泳動距離を長くすると分離度は可成り良好となる。この場合の分離度の好転化には、泳動時間の延長による汚紙面上のイオン強度の増加が大きな役割を果しているものと考えられる。また一般的にいって、open method における分離度の良好化には、蒸発に起因する汚紙面上のイオン強度の増加が主役を演じていると結論してもよいであろう。

なお、著者は正常血清を用いてイオン強度と分離度との関係について観察したが、Ressler et al.¹⁸⁾は、macroglobulin などの異常蛋白は一定以上のイオン強度では汚紙上に沈澱し泳動しないことを報告している。この様な事実からも泳動像の分離とイオン強度の撰択は実際的にも極めて重要な問題であることが知られる。

III 泳動像の分離 (分離度ならびに鮮明度) と電圧ならびにイオン強度の相互関係について

理論的に考えると、緩衝液中の帯電蛋白粒子の泳動速度には、1) 電場の強さ、2) 蛋白粒子を取り巻く反対電荷の緩衝液イオンの量、3) 蛋白粒子に衝突する同種または反対種の緩衝液イオンの量 (イオン流 宮本、中川¹⁶⁾、中川ら¹⁶⁾) などに関係するものと考えられる。蛋白粒子の電荷、分子の形、緩衝液イオンの種類などの因子が一定とすると電場の強さは蛋白粒子の移動速度を支配するが 2) の因子は泳動に対する抵抗となり泳動速度を減ずる。すなわち分離は 1) と 2) の相互関係に主として左右されると考えられる。さらに 3) の場合陽イオン流は陰の蛋白粒子の尖端の泳動を妨げ (陽イオン流は陰極の方へ遠ざかるから)、陰のイオンは反対に蛋白粒子を陽極の方へ押しやる。すなわち、蛋白粒子の拡散を抑制するように作用し鮮明度に関係するものと考えられる。とくに 2) は緩衝液イオン強度に、3) は緩衝液イオン強度および電場の強さに関係している。したがって泳動像の分離度と鮮明度に関しては電圧とイオン強度とは不可分の関係をもっている。汚紙法ことに open method では汚紙上の緩衝液のイオン強度が電圧にも関係しているために条件はさらに複雑になつている。これらの考察から電圧と緩衝液のイオン強度の両者が関連して、泳動後の良好な分離状態に関係があることが考えられ、良好な泳動像は電圧および緩衝液のイオン強度の適当な組み合わせ条件下ではじめて得られるものと思はれる。open method ではさらに汚紙上の緩衝液流の大きさやイオン強度の相対的な上昇が電圧や緩衝液イオン強度や、泳動時間などに関係していることにも注意しなければならない。著者は上記の理論的な考察および実験成績に基づいて良好な泳動像を得るために次のよ

うな泳動条件の control が好ましいと考えている。(1) 血清量の多い場合には、緩衝液のイオン強度を大きくすること、電圧を少し高くすること、および泳動距離を長することなどによって、各分画蛋白の濾紙上の拡散をおさえると、適当な分離度と鮮明度を持つた泳動像を得ることができる。著者は血清塗布量 0.005~0.01ml/2cm の場合には、定電圧、200V, $\mu=0.075$ で、Alb の塗布位置からの泳動距離が 8cm, 血清塗布量 0.03~0.05 ml/2cm の場合には、Alb の泳動距離が 12cm の場合がよいことを知った。(2) 外気温の変化によって泳動速度が影響を受けることは Grassmann & Hannig⁹⁾, McDonald²¹⁾ が指摘している。従来は泳動装置の熱学的性質に種々検討を加えて、温度の影響をできるだけ少なくする方法が工夫されてきた (McDonald²¹⁾, Svensson²²⁾)。このような方法は当然移動度の実験には必要である。しかしまた外気温に従って泳動条件を変化させて良好な分離をうるようにすることもできる。外気温が高い場合には、濾紙上で発生した Joule 熱の拡散は十分ではなく、泳動装置内の温度は外気温よりやや上昇し、試料の移動速度および緩衝液流も大きくなり、短い泳動時間で一定の泳動距離に達する。この場合の泳動像の分離状態は電圧を上げた場合のそれに類似している。したがって、この場合には電圧を低下げるか、緩衝液のイオン強度を少し下げるか、またはその両者を併用する。または泳動距離を少し短縮してもよい。外気温が少し低い場合には反対に電圧を少し上げるか緩衝液のイオン強度を少し上げるか、またはその両者を組み合わせて行なえばよい。または泳動距離を少し延長してもよい。

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、濾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美氏に感謝する。

文 献

- 1) 山口延男：生物物理化学，印刷中
- 2) 小林茂三郎，村井京子：臨床検査，**2**, 139 (1958)
- 3) 山口延男：生物物理化学，印刷中

- 4) Grassmann, W. & Hannig, H.: Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem., **290**, 1 (1952)
- 5) Grassmann, W. Hannig, W. & Hannig, H.: Klin. Wschr., **32**, 838 (1954)
- 6) Block, R. T., Durrum, E. L. & Zweig, G.: A Manual of Paper Chromatography and Paper Electrophoresis, Academic Press. (New York), 1955, p. 364-365
- 7) Holt, C. V., Voigt, K. D. & Gaede, K.: Biochem. Ztschr., **323**, 345 (1952)
- 8) Longworth, L. G.: Chem. Rev., **30**, 323 (1942)
- 9) Turba, F. & Enenkel, H. J.: Naturwiss., **37**, 93 (1950)
- 10) 向野栄：内科室函，**5**, 585 (1958)
- 11) 小島津彦：日大医誌，**15**, 12 (1956)
- 12) Kunkel, H. G.: Methods of Biochem. Analysis, **1**, 141 (1954)
- 13) 香月武人：生物物理化学，**2**, 16 (1955)
- 14) 畑下：宮本璋，杉本良一編，濾紙電気泳動シンポジウム第一集，文光堂（東京），1958, p. 35
- 15) Franglen, Ciba Foundation Symposium on Paper Electrophoresis, J. & A. Churchill Ltd (London), 1956, p. 110
- 16) 宮本璋，中川秀一，佐野純，高橋進：内科の領域，**5**, 331 (1957)
- 17) Ressler, N. & Jacobson, S. D.: Clin. Chim. Acta., **2**, 372 (1957)
- 18) Ressler, N., Nelson, N. A., Richard, W. P. & Moy, T.: J. Lab. Clin. Med., **53**, 178 (1959)
- 19) Durrum, E. L.: Ciba Foundation Symposium (s.¹⁵⁾), p. 123-124
- 20) 中川秀一，佐野純，高橋進：内科の領域，**5**, 205 (1957)
- 21) McDonald, H. J.: Ionography, The Year Book Publisher, Chicago. 1955, p. 32
- 22) Svensson, H.: Ciba Foundation Symposium (s.¹⁵⁾) p. 86