カサゴの血液学的研究—III. 保存時間による血清蛋白分画の変化*

山下 秀 夫

(1968 年 7 月 8 日受理)

Haematological Study of a Species of Rockfish, *Sebastes marmoratus*—III. Change of Serum Protein Fractions during Storage

Hideo YAMASHITA**

The electrophoretic technique with cellulose acetate membrane was applied to rockfish serum to analyze the change in the amount of serum protein and its fractions which occurred during the course of storage.

The difference of electrophoretic patterns with sex was also examined.

Sampling of the blood and measurements of serum protein, haematocrit, urea nitrogen level of serum were done following the same techniques as used in the previous investigations^{5,6}. In addition, the electrophoresis was also used. Immediately after the sampling, the blood was centrifuged for 30 minutes at 2,500~3,000 rpm to obtain the serum.

The serum was then stored in a refrigerator with temperature between 4° and 7°C. *Electrophoretic apparatus*: Separax Micro Analysis (Jō Kō Sangyō Co., Ltd.) with Separax cellulose acetate membrane.

Application of serum: Materials (0.0008~0.001 ml per 1 cm wide) were spread 1.5 cm from the edge of anode end of a strip. *Electrification*: Constant current of 0.8 mA/cm width of the strip was applied for 50 minutes. Electric pressure in this case ranged from 145 to 255 V.

Buffer solution: Veronal buffer pH 8.6, ionic strength 0.07.

Staining: Ponceau 3R for 90 seconds. *Destaining*: 1% glacial acetic acid solution. *Quantitative measurement*: After being made transparent with liquid paraffin, electropherograms were estimated for extinction at the center with 0.5×0.6 mm slit at 500 mμ using Atago Self Recording Densitometer (Ozumor Types 7 and 8, Atago Optical Works Co., Ltd.)

To compare the electrophoretic patterns obtained, normal human serum (Moni-Trol 1; Dade Reagents Inc.) was used. The amount of serum protein appeared to increase with the duration of storage (Table 2).

Five peaks were observed clearly in the fresh materials of both sexes just after the sampling of blood. The differentiation of the peaks, however, lessened with the prolongation of preservation. The position of each component, especially of the first peak, showed a trend to move toward the anode (Fig. 1). The electrophoretic patterns seemed reproducible during only 3 days after the sampling (Fig. 1).

The pattern of serum proteins had five components for both male and female. No component equivalent in migration to albumin of normal human serum was observed. The maximum peak for the male appeared at the position of human globulin alpha 2, and that for the female occurred at human globulin beta (Fig. 2). Component-IV was the largest in both male and female (Table 4).

* 西海区水産研究所業績第 222 号

Contribution from the Seikai Regional Fisheries Research Laboratory, No. 222

** 西海区水産研究所 (Seikai Regional Fisheries Research Laboratory, Nagasaki, Japan)

魚類血液の電気泳動法による研究は、IRISAWA ら¹⁾のガンギエイ、ネコザメの血清分析、斎藤²⁾の海産魚、淡水魚 12 種の血清電気泳動のパターンと人間ならびにウサギのそれとの比較、SULYA³⁾のメキシコ湾産魚類およびイルカの種による泳動パターンの差の検討、TSUYUKI ら⁴⁾の血漿蛋白によるサケ属の種間関係の研究など、魚類の血液学的研究の有効な方法として行なわれてきた。

著者はさきに魚類生態の生理学的な解析の一環として、カサゴ (*Sebastiscus marmoratus*) を用い環境の塩素量変化が血液諸要素に及ぼす影響⁵⁾、疾病時の血液性状の変化⁶⁾ などについて報告した。研究を進める一手法として血清蛋白質組成を調べるに当り、すでに、ニジマスの血漿⁴⁾ および正常人血清については、保存の条件や期間によつて蛋白分画が変化することが知られているから^{7,8,9)}、現場において採血後、研究室に持ち帰つて分析を行なうまでの経過時間の影響を明らかにする必要がある。本実験では、セルローズ・アセテート膜による電気泳動法を用いてカサゴの血清蛋白分画を分析し、1~78 日間の冷蔵保存中の変化を検討し、さらに雌雄または生理条件の違いによる差、および正常人血清 (Moni-Trol 1) との比較を試みたので、それらの結果について報告する。

この研究をまとめるにあつて、北海道大学水産学部小林新二郎教授、黒木敏郎教授ならびに辻田時美教授は論文を校閲され有益な御批判を賜つた。長崎大学医学部中央検査部糸賀 敬助教授には電気泳動について懇切な御指導を受けた。西海区水産研究所青山恒雄博士には適切な助言をうけ、各種の便宜を計つていただいた。さらに、論文をまとめる過程で当所の安楽正照博士の好意ある協力を得た。これらの各位に対して心から謝意を表する。

材 料 と 方 法

1965 年 7 月 26 日、長崎市深堀町沖の一本釣と、翌年 1 月 10 日長崎市東長崎町網場沖の刺網でとられたカサゴを、コンクリート製 (0.7 m³) とプラスチック製 (0.4 m³) の循環水槽で飼育した。餌料のちがいが血液成分におよぼす影響をさけるため、餌としては小エビ類のみをあたえた。また、実験期間中餌育水槽の水温、塩分に著しい変化はなかつた。

血液採取： 全血液比重・血清蛋白量・ヘマトクリット値・血清中尿素窒素量および水素イオン濃度等の測定は前報^{5,6)}と同一方法によつた。

電気泳動は次の要領で行なつた。血清分離： 採血後直ちに 2,500~3,000 rpm で 30 分間遠心分離し、保存は 4°~7°C で行なつた。**装置：** セバラックス微量分析泳動装置 (常光産業株式会社)。

セルローズ・アセテート膜はセバラックスを用いた。試料の塗付： 血清の塗付量は膜幅 1 cm 当り 0.0008~0.0010 ml とし、陽極側の膜の端から 1.5 cm のところになるべく幅狭く塗付した。**通電：** 膜幅 1 cm 当り 0.8 mA の定電流を 50 分通電した。この条件で電圧は 145~255 V となる。**緩衝液：** ペロナール緩衝液 pH 8.6, イオン強度 0.07。**染色：** ボンソー 3R 染色液で約 1 分 30 秒間行なつた。**弁色：** 1% 氷酢酸溶液を用いた。**定量：** 直接法によつた。流動パラフィンで透明化した標本を波長 500 mμ で 0.5×0.6 mm のスリットを用い、中央部で吸光度を測定した。デンストメーターはアタゴオズマー 7 型および 8 型 (自記式) を使用。健康なカサゴの電気泳動パターンは 5 つの成分に分離されるが、本研究においては、便宜的に陽極側 (人血清のアルブミン側) から I, II, III, IV および V の符号で表わした。

結果ならびに考察

血清保存期間の長短による総血清蛋白量ならびに電気泳動パターンの変化 採血直後の新鮮な血清と、保存庫 (4°~7°C) に貯蔵したものとの間の電気泳動パターンの差異を検討するため、1965 年 11 月から翌年 7 月までに、標本を 1~78 日間保存し、その間 2~5 回泳動を行ない、46 例についてパターンの変化を観察した。Table 1 に実験に使用した個体の大きさ、雌雄、血液要素などを示す。

総血清蛋白量の値は測定時の条件によつて変ることが知られているが^{7,8,9)}、本実験においては、温度差など測定時の条件の変動による影響をうけないよう充分注意した。その結果保存期間が 6 日位の短期間の場合

Table 1. Elements of rockfish blood specimens kept in a refrigerator with the temperature ranging from 4°~7°C.

Sex	Specimen No.	T. L. (mm)	B. W. (gr)	Specific gravity of blood	Haematocrit (%)	Urea nitrogen level in serum (mg/100 ml)	Remark
Female	5	—	205	1.036	26.0		
	11	155	65	1.038	20.0		++
	12	155	80	1.034	16.0		+
	13	150	70	1.030	8.0		++
	14	190	140	1.031	18.8		+++
	15	85	65	1.034	25.5		++
	16	150	75	1.041	21.2		++
	17	175	100	1.033	18.5	10	+++
	27	220	235	1.029	14.0		
	29	220	230	1.035	19.5	10	**
	36	175	100	1.027	14.3		
	37	185	90	—	4.0		
	42	205	155	1.044	33.0		
	43	175	110	1.039	25.8		
Male	4	—	220	1.035	25.0		
	6	—	105	1.041	27.2		
	7	—	215	1.044	32.8		
	8	—	145	1.032	17.8		
	9	—	140	1.039	27.0		
	10	140	60	1.037	21.0		
	18	180	110	1.031	21.0	<10	*
	19	150	60	1.031	21.8		
	20	150	65	1.031	18.0	<10	*
	21	125	50	—	25.5		
	22	190	120	—	20.0		
	23	190	130	—	18.2	10	*
	24	180	140	—	12.2	45	*
	25	180	—	1.030	17.0		
	26	145	60	1.030	16.3		
	28	200	190	1.037	20.7	10	**
	30	198	190	—	14.5		
	31	200	175	1.036	22.0		
	32	200	—	1.032	22.2		
	33	200	165	1.036	18.5		
	34	225	210	1.029	16.2		
	35	220	—	1.031	14.5		
	38	225	220	1.032	19.0		
	39	210	215	1.040	32.5		
	40	205	175	1.041	33.0		
	41	225	215	1.027	8.0		*
	44	207	195	1.026	8.5		*
	45	210	215	1.040	28.7		
	46	215	220	—	35.5		
Unknown	1	—	200	1.036	28.2		
	2	—	230	1.036	22.0		
	3	—	190	1.019	3.0		*

* Affected by ulcers. ** Diseased + Containing matured eggs.

++ Liberating viviparous larvae. +++ After liberation of larvae.

Table 2. Change of total serum protein concentration as analyzed by refractometry during storage at 4°~7°C.

Period of storage days	Specimen		
	# 32	# 33	# 34
1	4.6%	4.7%	4.4%
14	5.0	4.6	5.3
25	5.4	4.8	5.7
35	5.9	5.4	6.0
42	6.6	6.0	6.8

は総血清蛋白量の測定値には大きな変化はみられないが、より長期間になるとかなり値が不規則に変化することがわかった (Table 2)。そして、その値はいずれも採血直後に比しより高い値をしめす。勿論総蛋白量の真の増加ではなく測定上の(所謂見掛け)変化と考えられるが、この点については今後詳細に検討する必要がある。

つぎに、採血直後の血清の電気泳動パターンと、ある期間保存した血清のそれとのちがいをしらべた (Fig. 1)。採血直後のものは、各成分の分離が明りようであるが、保存期間が長くなるとともに不明りようとなる。TSUYUKI⁴⁾によるとニジマスの新鮮

な血漿蛋白の凍結材料を一週間保存してしらべたところ大きな変化はみとめられなかつたので、更に長く貯蔵しても著しい変化は起らないであろうと推察している。しかし、標本を繰返し凍結したりとかしたりするとある部分の分画が失われる¹⁰⁾。いつぼう、河合¹¹⁾は 4°~6°C の冷蔵庫に人血清を保存すると、4 日以後に α 領域の蛋白が増え、さらに長期間おくと Albumin は減り、しかも α_1 と α_2 の分離が悪くなると同時に、 α 領域の分画値が高く出ることを認め、血清蛋白は非常に変性しやすく移動度が変わるので、長期保存すると分離がむずかしくなり、4 日以内保存した材料以外は使用に耐えないと報告している。大村¹²⁾は人血清を氷結して保存した場合、5 日以後でも各分画に変化は認められず、また無菌の場合は 4°C で 1 週間、30°C で 24 時間経過した標本でも各分画の百分率には変化がないが、30°~50°C の保存温度では α および β -グロブリンに変化が認められ、それ以上の高温ではアルブミンおよび γ -グロブリンにも変化が現われることを確認した。血漿蛋白分画ならびにその移動度について、内山¹³⁾は氷室に 30 日間保存しても移動度にはほとんど変化はないと述べ、足立¹⁴⁾は室温で放置すると、36 時間以後 β -グロブリンの移動度が大きく、クエン酸ソーダを加えたら 8 年間保存でも大きな変化はないと述べている。これらの報告は泳動パターンが保存の条件によつてはかなり変わることもあることを裏付けているが、本実験の場合、パターンが原点の位置から陽極寄りに現われる成分は陽極側へ、陰極寄りに現われる成分は陰極側へそれぞれ偏る傾向がみられた (Fig. 1)。このようにカサゴの電気泳動パターンは保存期間の長さに影響されることが判明した (性別・仔魚産出時期・その前後期および健康状態などによつても異なるようであるが別に報告する)。いつぼう、保存期間が 3 日以内であれば採血直後のパターンとほとんど差は認められない (Fig. 1)。健康魚の雌 4 尾、雄

Fig. 1. Changes in electrophoretic patterns of rockfish serum protein during at 4~7°C.

Table 3. Change of electrophoresis pattern of serum during storage at 4°~7°C.
a: migration distance from origin (cm), b: percentage composition.

Specimen	Period of Storage (days)	Component									
		I		II		III		IV		V	
		a cm	b %	a cm	b %	a cm	b %	a cm	b %	a cm	b %
#4	1	+1.24	19.3	+0.63	16.6	+0.42	27.8	+0.05	23.6	—	12.7
	29	+1.62	16.1	—	17.8	+0.40	29.5	+0.29	20.5	—	16.1
#5	1	+1.35	16.2	+0.56	16.3	—	17.0	—	33.5	—	17.0
	29	+1.48	12.4	—	—	—	31.5	—	34.4	—	21.8
#7	1	+1.22	18.1	+0.56	13.9	+0.32	29.2	-0.11	23.4	-0.65	15.4
	29	—	17.4	+1.22	—	+0.64	48.2	+0.20	19.2	-0.21	15.2
#8	1	—	24.3	+0.38	28.2	-0.06	—	—	36.1	-0.66	11.4
	29	+1.81	10.2	+0.79	45.2	+0.58	10.8	+0.39	24.1	-0.04	9.7
#32	1	+1.31	9.7	+0.65	16.9	+0.36	28.3	-0.12	24.8	-0.66	20.3
	14	+2.08	23.3	+0.70	16.4	+0.32	21.0	+0.25	27.4	-0.70	11.9
	25	+1.42	21.6	+0.55	15.6	+0.30	21.6	—	—	—	41.2
	35	+1.44	18.5	+0.62	9.5	+0.22	28.4	-0.42	32.0	-0.95	11.6
	40	+1.45	20.2	+0.30	15.3	+0.09	24.6	—	—	—	39.9
#33	1	+1.30	26.7	+0.60	15.7	+0.31	17.4	-0.10	21.5	-0.58	18.7
	14	+2.46	21.8	+0.66	15.4	+0.26	30.5	-0.11	18.9	-0.58	13.4
	25	+1.31	24.0	+0.36	12.5	+0.09	25.5	—	—	—	38.0
	35	+1.69	29.5	+0.77	11.9	+0.62	21.7	—	—	—	36.9
	40	+1.48	20.3	—	—	—	46.9	—	—	—	32.8
#34	1	+1.16	30.7	+0.51	11.2	+0.25	22.2	-0.15	22.7	-0.56	13.2
	14	+1.85	16.3	—	—	—	42.1	—	—	—	41.6
	25	+1.10	21.7	+0.40	3.7	+0.19	29.1	—	—	—	45.5
	35	+1.95	30.1	+0.75	7.4	+0.40	22.8	-0.14	25.0	-0.70	14.7
	40	+1.32	21.0	—	—	—	37.8	—	—	—	41.2
#35	1	+1.02	24.6	+0.46	8.0	+0.18	23.2	-0.21	26.1	-0.66	18.1
	14	+1.20	26.3	+0.70	4.3	+0.38	28.2	-0.05	29.0	-0.55	12.2
#36	1	+1.11	18.6	+0.52	33.3	—	19.5	—	22.8	—	5.8
	14	+1.50	10.6	+0.31	42.0	—	15.0	—	27.0	—	5.4
	25	+1.50	12.4	+0.41	44.0	—	—	—	43.6	—	—
#39	1	+1.64	13.1	+0.52	23.1	+0.22	24.6	-0.21	25.6	-0.71	13.6
	3	+2.24	13.3	+0.71	24.4	+0.20	27.2	-0.48	24.4	-0.82	10.7
	11	+2.11	12.9	+0.72	21.2	+0.39	25.8	-0.16	25.8	-0.61	14.3
#40	1	+1.70	15.4	+0.50	22.8	+0.16	22.8	-0.25	25.4	-0.82	13.6
	3	+2.41	14.1	+0.62	22.3	+0.18	23.9	-0.38	27.7	-0.82	12.0
	11	+2.08	12.5	+0.84	19.9	+0.50	24.3	-0.02	24.9	-0.56	18.4
#42	1	+1.89	18.9	+0.55	18.3	+0.29	20.6	-0.11	22.2	-0.64	20.0
	3	+1.74	15.5	+0.70	15.7	+0.34	23.7	-0.25	27.7	-0.72	17.4
	11	+1.98	12.0	+0.82	14.0	+0.56	24.0	+0.12	31.5	-0.28	18.5
#43	1	+1.31	15.4	+0.64	17.0	+0.29	25.2	-0.06	25.4	-0.60	17.0
	11	+1.69	20.1	+0.75	11.0	+0.41	30.0	-0.11	22.5	-0.56	16.4

Fig. 2. Comparison of the electrophoretic pattern of normal human serum (Moni-Trol 1) with that of rockfish.

Table 4. Comparison of percentage compositions of protein fractions of human (Moni-Trol 1) and rockfish serums. As for the compositions of rockfish serum, 9 male and 4 female serum specimens were analyzed and averaged.

Source	Component	Sex	Percentage composition
Rockfish	I	Female	18.9%
		Male	15.4
	II	Female	18.3
		Male	22.8
	III	Female	20.6
		Male	22.8
	IV	Female	22.2
		Male	25.4
	V	Female	20.0
		Male	13.6
Human (Moni-Trol 1)	Albumin		64.0%
	α_1 -globulin		4.1
	α_2 -globulin		7.6
	β -globulin		9.9
	γ -globulin		14.5

9尾について、各成分 (I~V) の原点からの距離、移動距離、各成分の分画値の割合の変化などが保存期間の経過にともなつてどのように変わるかを Table 3 にしめす。保存期間の経過にともなつて成分 I・II および III は原点 (塗付点) から陽極側に、成分 IV および V は陰極側にそれぞれ移動する傾向がある。各成分の移動距離は、時間の経過とともに徐々に大きくなり、10 日をすぎると移動幅が最も大きく、それ以後は徐々に小さくなり、25 日すぎに最低値をしめす。しかし、30 日以後には再び急激に移動距離は大きくなる。

各成分の分画値も 3 日頃までは、ほとんど差異がみられないが、5 日以後になると増減が著しく、特に各成分の分画がむずかしくなる。これらの結果は松村ら¹⁰⁾、河合¹¹⁾、大村¹²⁾の研究結果とも一致している。

以上のように魚類血清の電気泳動パターンを比較するときは、採血後短時間の間に、保存条件を一定に保つた材料を用いて実験を行なうことが重要で、止むを得ず長期保存の標本を用いるときは結果の考察に当つては充分注意する必要がある。

正常人血清と正常なカサゴ血清の電気泳動パターンの比較 コンクリート製水槽に飼育した標本の中で、鰓裂が赤黒色を呈し、正常と思われる雌 4 尾および雄 9 尾と正常人血清 (Moni-Trol 1) との比較を行なつた。カサゴと正常人の血清パターンを比較すると、正常人のアルブミンに相当するものは、移動度あるいは濃度比からみてカサゴには認められず、斎藤²⁾の実験結果と一致する。正常なカサゴの交尾前期に採血を行なつたものの最大濃度を示す位置 (移動度) は、雄では正常人血清の α_2 -グロブリンに、雌では β -グロブリンに相当するところにそれぞれ認められるが、各成分の分画値を比較すると、雌雄ともに正常人血清の β -グロブリンに相当する IV 成分が両者とも最も高い値をしめしている (Fig. 2, Table 4)。

要 約

1. 血清蛋白組成におよぼす採血後の保存期間の影響を知るため、採血直後の新鮮なカサゴ血清と、保存庫 (4°~7°C) に 1~78 日間貯蔵したものの電気泳動パターンの差異を検討した。

2) 採血直後の血清蛋白について電気泳動を行なうと5つの成分にわかれ、それらの分離は明りようであった。しかし、保存日数が長くなると、成分の分離は不明りようとなる。さらに、成分 I, II および III は原点から陽極側へ、成分 IV および V は陰極側へそれぞれ偏よることが認められ、特に成分 I の陽極側への移動は著しかった。

3. 採血後3日以内に測定すれば、泳動パターンは採血直後のものとほとんど変わらないが、3日目以後はパターンが著しく変化した。

4. カサゴの血清蛋白の電気泳動パターン(4~6月測定)は、雌雄とも正常人血清(Moni-Trol 1)のアルブミンに相当するものは得られず、雌は β -グロブリン分画に、雄は α_2 -グロブリン分画に、それぞれ最大濃度をしめす成分が認められ、分画値は雌雄とも IV 成分が最高値をしめた。

文 献

- 1) H. IRISAWA and A. F. IRISAWA: *Science* **120**, 849~851 (1954).
- 2) 斎藤 要: 本誌, **22**, 760~767 (1957).
- 3) L. L. SULLY and G. GORDON: *Amer. J. Physiol.* **200**, 152~154 (1961).
- 4) H. TSUYUKI and E. ROBERTS: *J. Fish. Res. Bd. Canada*, **23**, 101~107 (1966).
- 5) 山下秀夫: 本誌, **33**, 81~90 (1967).
- 6) 山下秀夫: 本誌, **33**, 995~1001 (1967).
- 7) 中村健三: 臨床検査, **2**, 739 (1958).
- 8) 林 康之・平沢正人・菅原カツエ・鮎沢邦枝: 臨床病理, **14**, 681 (1966).
- 9) 丹羽正治: 臨床科学, **3**, 739~743 (1967).
- 10) 松村義寛・河合 忠・松橋 直・天木一太: 臨床検査, **11**, 13~21 (1967).
- 11) 河合 忠: 臨床検査, **11**, 13~21 (1967).
- 12) 大村 武: 生物物理化学, **1**, 130~131 (1952).
- 13) 内山長能・石村貞雄: 生物物理化学, **2**, 54 (1955).
- 14) 足立光夫: 生物物理化学, **3**, 268~269 (1956).