

第4回細管式等速電気泳動分析シンポジウム

講演要旨集

主 催 イソタコ研究会
共 催 日本化学会, 日本分析化学会, 電気泳動学会
日本薬学会, 日本生化学会, 日本農芸化学会
日本臨床化学会
日 時 昭和59年12月14日(金) 9:15~17:00
会 場 東京都立大学学館ホール
東京都目黒区八雲1丁目1-1

第4回等速電気泳動シンポジウム

プログラム

午前の部

昭和59年12月14日(金) 9:15~17:00

- | | | |
|-------|---------------------------------------|-------------------------------------|
| 9:15 | 開会の辞 | 都立大 理 奥山典生 |
| 演題番号 | | |
| 9:20 | | |
| 1. | 等速電気泳動法における分離過程のシミュレーション | 広島大 工 ○広川 健・木曾 義之 |
| 9:35 | | |
| 2. | 水-メタノール混合溶媒における1価イオンの移動度と分離挙動の検討 | 広島大 工 ○津吉 徹・広川 健
木曾 義之 |
| 9:50 | | |
| 3. | 等速電気泳動法におけるホスト-ゲスト相互作用の応用 | 九大工・熊工大工 ○早下 隆士・藤野 泰光
田崎 正人・高木 誠 |
| 10:05 | | |
| 4. | PG微分法によるアミノ酸およびペプチドの等速電気泳動図のマイコンによる処理 | 城西大 理 小林英三郎 |
| 10:20 | | |
| 5. | 高電圧キャピラリー電気泳動による分離(3) -金属イオン等について- | 名工大 工 津田 孝雄 |
| 10:35 | | |
| 6. | 界面動電現象を利用した液体クロマトグラフィー | 京大 工 ○大塚 浩二・寺部 茂
安藤 貞一 |
| 10:50 | | |
| 7. | 植物色素アントシアニン類の細管式等速電気泳動 | 杏林大保健・信州大理 ○平岡 厚・吉玉国二郎 |
| 11:05 | 休憩(15分) | |
| 11:20 | | |
| 8. | 細管式等速電気泳動法の潤滑油への応用 | 神奈川工試 ○村井 省二・千葉 彰三
川口 明広 |
| 11:35 | | |
| 9. | 細管式等速電気泳動法による除草剤(パラコート)の分析 | 島津応技 日根 隆 |
| 11:50 | | |
| 10. | 細管式等速電気泳動法の医薬品分析への応用(第2報) 製剤中のアニオンの分析 | 徳島文理大薬・島津応技 ○香西 重忠・赤田 吉信
八木 孝夫 |
| 12:05 | | |
| 11. | 共沈濃縮-細管式等速電気泳動法による海水中のフッ化物イオンの定量 | 神戸商船大・大阪工試 ○福士 惠一・日色 和夫 |
| 12:20 | | |
| 12. | 紙の褐色斑(foxing)の有機酸について | 東京文化財研 ○新井 英夫・香椎 健
会田 孝士 |

午 後 の 部

演題番号

13:20

[特別講演]

細管式等速電気泳動法による生体成分の分析

高 知 医 大 化 学 児 玉 裕 敬

14:20

13. インタコフォレシスによる赤血球内 2,3 の物質の測定とその臨床応用について

南 岡 山 病 院 ○木畑 正義・三島 康男
出宮 通孝・渡辺 佳子

14:35

14. 細管式等速電気泳動法による精液コリンの定量

高知医大法医・高知医大化学 ○津々見 明・沖 義一
石津日出雄
揚田 富子・児玉 裕敬

14:50

15. 微量顎関節液の糖蛋白に関する研究(特にヒアルロン酸, コンドロイチン硫酸の定性, 定量法について)

大阪歯大口腔・大阪歯大化学 ○森本伊智郎・久保 誼修
植野 茂・覚道 健治
白数 力也
二川 修治・外川 啓一

15:05

16. 細管式等速電気泳動法による人赤血中の Prolidase, Prolinase, Proline iminopeptidase 活性の測定

高知医大化学・高知医大皮膚 ○三笠 洋明・児玉 裕敬
荒田 次郎

15:20

休憩 (15分)

15:35

17. タンパク質の細管電気泳動

都 立 大 理 ○奥山 典生・真鍋 敬

15:50

18. 等速電気泳動法によるタンパク質の陽イオン分析

島 津 応 技 ○八木 孝夫・児嶋佳世子

16:05

19. 等速電気泳動法によるオオムギホルテインタンパク質の分析

キリンビール原料研 ○柿内 久弥・川野 隆明

16:20

20. 細管式等速電気泳動法による鼻アレルギーモデル鼻汁蛋白成分の研究

東レ開発研・自治医大法医 ○奥泉 仁一・田中 健一
吉田 治弘・池本 卯典

16:35

21. 細管式等速電気泳動法によるヒトおよびウマ血清の Tf 型の遺伝的多型性の検討

自 治 医 大 法 医 ○吉田 治弘・池本 卯典
富田 功一

16:50

閉会の辞

都 立 大 理 奥 山 典 生

(広大工) 広川 健・木曾義之

1. 既に報告したように、定常状態における等速電気泳動平衡はコンピューターを用いれば容易にシミュレートできるため、この手法を実際の定性および定量分析に応用する事ができる。しかし具体的にある量の試料を分離するのに必要な細管の長さや電解液条件などをシミュレートするためには、別に分離過程の理論的解析が必要である。非定常状態(混合ゾーン)の解析はAlberty¹⁾の動界面電気泳動の理論にもとずいて既にBrouwerら²⁾やMikkersら³⁾により試みられている。特にMikkersは初めて具体的な一価アニオンの分離過程を詳細に検討し、弱酸のアニオンについては実測した分離能と理論からの予想が良く一致する事を示したが、強酸と弱酸の分離については実験結果を再現する事は出来なかった。演者らの解析法ではこの点を改良しただけでなく、一般的な多価イオンについても適用可能である。本講演ではこの解析法をいくつかの有機酸およびアミノ酸の分離に適用し、分離された試料の配列の決定における混合ゾーンの役割について報告する。

2. 混合ゾーンとは試料を注入して電流を流し始めた直後から生成し始めるゾーンで、複数の試料が過渡的ではあるが均一に混合している状態を言う。この混合ゾーンを解析するにあたって従来の方法と異なる点は、注入した試料ゾーンと生成する混合ゾーンの界面を単純な濃度界面として取り扱わず界面速度を0と仮定しない事、また H^+ および OH^- 濃度を全てのゾーンの電気導度の計算において無視しない事の2点である。ここでは解析法の詳細は省略するが、シミュレーションによるとMikkersらが実測したformate-glycolateおよびformate-chlorate系の混合ゾーンの解消する時間を精度良く再現する事ができた。

3. イソタコフォレシスにおける試料(A, B, C, D)の配列は定常状態における実効移動度(\bar{m})の間に次の関係が成立するとき

$$\bar{m}_L > \bar{m}_A > \bar{m}_B > \bar{m}_C > \bar{m}_D > \bar{m}_T \quad 1)$$

A, B, C, Dの順に検出されるのが普通である。ここにLはリーディングイオンを、Tはターミナルイオンを示す。一方、Mikkersらが指摘しているように、電位勾配検出器や電導度検出器でstep heightが同一で単成分として観測されるゾーンであっても実際には二成分が分離しておりUV検出器で確認された例がある。(図-1)

さらに現象的にはかなり以前から知られている、いわゆる'enforced isotachopheresis'においては普通昇順にあらわれるはずの試料ゾーンが逆転している。これらの事より試料A B C Dがこの順に検出される場合でも定常状態の実効移動度(\bar{m})の順番は必ずしも1)式によらない事を意味している。すなわち電解液条件によっては、例えば

$$\bar{m}_L > \bar{m}_A = \bar{m}_B > \bar{m}_C < \bar{m}_D > \bar{m}_T \quad 2)$$

の関係が成立するときにも試料はA B C Dの順に分離されることがある。このような現象は全て分離過程において試料間に生成する混合ゾーン中の \bar{m} の大小関係によるものである。

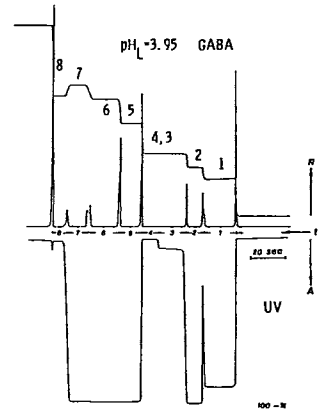


図-1 1. ATP, 2. スルファニル酸, 3. マンデル酸, 4. 乳酸、5. GMP, 6. A3MP, 7. AMP, 8. 酢酸

(1)定常状態において $\bar{m}_A = \bar{m}_B$ であるがA, Bの順に分離される場合

この場合についてはMikkersがマンデル酸と乳酸を $pH_L = 3.95$, バッファー; γ -アミノ酪酸(GABA)で分離した例がある(図-1)。表-1にこれらの試料の定常状態および混合ゾーンのシミュレーションにより求めたpHと \bar{m} を示した。また図-2に $\bar{m}-pH$ 曲線を示した。表-1より、混合ゾーンではマンデル酸の \bar{m} が乳酸のそれより大きく先行する事がわかる。また $20cm \times 0.5mm$ I.D.の細管を使用した場合、分離可能な試料($pH=4$)は約 $4nmol$ と推定された。この量は pH_L に敏感で 4.08 の近傍では殆ど分離不可能と推定された。なおこれより高いpH領域では乳酸がマンデル酸に先行して再び分離可能になる。

表-1 マンデル酸(A)と乳酸(B)の分離

	Aゾーン	混合ゾーン	Bゾーン	A	B	GABA
R_E	2.907		2.907	$m_0 \times 10^5$ 31.8	36.5	33.7
pH	4.227	4.261	4.295	pKa 3.411	3.86	4.031
$\bar{m} \times 10^5$	25.70	25.95(A) 25.18(B)	25.70			

(2)定常状態において $\bar{m}_C < \bar{m}_D$ であるがC, Dの順に分離される場合(enforced isotachopheresis)

この場合についてもMikkersが(1)と同条件でAMPと酢酸の例を報告している(図-1)。表-2にこれらの試料の定常状態および混合ゾーンでのシミュレーションの結果を示した。表-2より、混合ゾーンではAMPが酢酸より先行し、その結果enforced isotachopheresisの現象がおこる事がわかる。混合ゾーン中の酢酸がもしAMPゾーンに入っ

た場合 \bar{m} は 13.6×10^5 に低下しその結果再び混合ゾーンに戻されるためこの配列は変化しない。この事は分離が完了して混合ゾーンが解消しても同じである。シミュレーションによるとこの条件で分離可能な試料 ($pH=4$) は約 10 nmol である。この現象は同じバッファを使用する限り pH_L = 約 3 まで変化しないが、 $pH_L = 2.95$ では (1) と同じ現象がおけると推定された。なお pH_L が 4.09 近傍では分離不可能となるがこれより高い pH_L では再び分離可能となるが順番は逆転する。このように (1) と (2) の場合は別の現象ではなく基本的には同じ原因、すなわち \bar{m} が等しくなる pH が存在する事によるものである。逆に $\bar{m} - pH$ 曲線が交差しない試料間では定常状態の \bar{m} が混合ゾーンにおける \bar{m} の大小関係と常に同じであるため、例外なく 1) 式のように配列する。分離が事実上不可能である場合は定常状態の \bar{m} ではなく混合ゾーンにおける \bar{m} がほとんど等しい場合であり、逆に混合ゾーンにおける \bar{m} の差が大きいほど分離は容易である。

表-2 AMP (C) と酢酸 (D) の分離

	Cゾーン	混合ゾーン	Dゾーン
R_E	4.815		4.251
pH	4.413	4.479	4.594
$\bar{m} \times 10^5$	15.51	16.11 (C) 15.02 (D)	17.57

	C	D
$m_o \times 10^5$	22.6	39.5
pKa	3.981	6.791
		4.756

以上のような過渡的状态を考慮したイソタコフェログラムのシミュレーションも可能である。この例をアミノ酸の分離について示した。試料はアスパラギン酸 (Asp)、タウリン (Tau)、トレオニン (Thr)、ヒスチジン (His)、グリシン (Gly)、およびロイシン (Leu) である。His と Gly は $pH_L = 9$ (バッファ、エタノールアミン) で enforced isotachopheresis をおこすと予想された。図-3 左に分離過程の模式図を示した。ゾーン内の数値は pH、括弧内の数値は $\bar{m} \times 10^5$ 、図-3 右は $\bar{m} - pH$ 曲線である。この電解液条件でのシミュレーションにより得られたイソタコフェログラムを図-4 左に、実測結果を図-4 右に示した。良く一致している事がわかる。

分離過程のシミュレーションはマイコン (SORD M223) を使用しているが 2 試料の場合でもデータ入力の段階から計算終了まで 5~6 分かかる。かなり多くの電解液系および試料にこの方法を適用した結果、critical な pH_L 領域を除くと試料の配列順の決定の目的には次のような簡便法が適用できる事がわかった。始めに各試料のリーディングゾーンにおける \bar{m} を計算する。Lゾーンで \bar{m} 最大の試料がまず 1 番目の試料ゾーンとなる。ついで 1 番目の試料ゾーンにおける残りの試料の移動度を求め、この中で \bar{m} が最大の試料が 2 番目の試料ゾーンとなり以下同様にして順番が決定できる。図-4 に示したアミノ酸の enforced isotachopheresis においてはこの方法で推定した結果と混合ゾーンの解析により求めた結果が一致した。

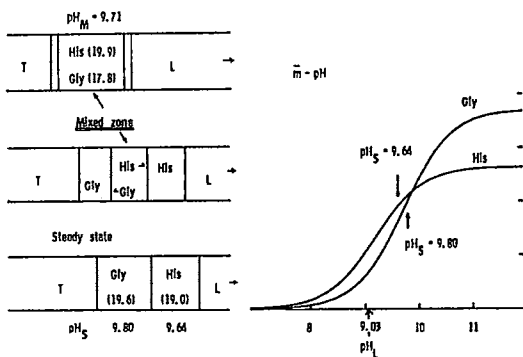


図-3 Gly と His の分離挙動

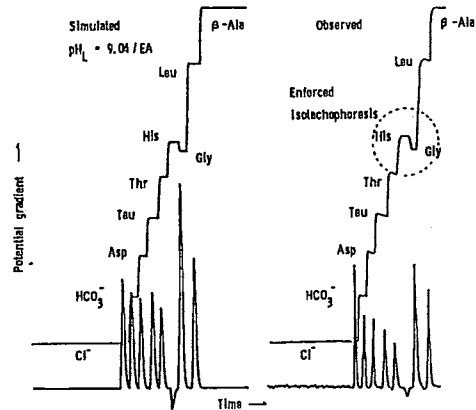


図-4 アミノ酸のイソタコフェログラムのシミュレーションと実測結果

(参考文献)

- 1) R. A. Alberty. J. Am. Chem. Soc. 72 (1950) 2361.
- 2) G. Brouwer and G. A. Postema. J. Electrochem. Soc. Electrochem. Sci. 117 (1970) 874.
- 3) F. E. P. Mikkers, F. M. Everaerts and J. A. F. Peek. J. Chromatogr. 168 (1979) 293, 317.

2 水-メタノール混合溶媒における一価イオンの移動度と分離挙動の検討

(広大・工) ○津吉 徹・広川 健・木曾 義之

1. 諸言 等速電気泳動法 (IP) 法は、イオン性物質の実効移動度 (\bar{m}) の差を利用して分離分析を行う方法で、実効移動度は $\bar{m} = a_i \gamma_i m_0$ (m_0 : 絶対移動度, a_i : 解離度, γ_i : 補正係数) で表わされる。実効移動度は、pH 効果 錯体効果の他に、水および有機溶媒における溶質-溶媒相互作用の相違による溶媒効果の影響を受ける。すなわち、水溶液と非水溶媒およびそれらの混合溶媒系では、誘電率や粘度あるいは溶媒和の状態が異なるため、イオンの絶対移動度や pKa に影響を及ぼし実効移動度が変化してくる。例えば水-メタノール混合系において、酢酸とギ酸の pKa は図-1¹⁾ に示すように溶媒の誘電率に応じて大きく変化する事が知られている。このため水溶液系では移動度が接近して分離が困難な場合や、溶解度の点から水溶液系では使用できない試料を取り扱いたい場合、非水溶媒の使用が効果的である。演者らは既に純メタノール溶媒を使用して 60 種のアニオンの分離挙動の解析により m_0 や pKa を算出し、この系におけるシミュレーションを可能にした²⁾。その結果、取り扱える試料の範囲は広がったが、分離の面からは、移動度が接近している試料が多く必ずしも純メタノール系の方が優れているわけではないことが分かった。そこで本研究では両者の特徴を生かすために、水-メタノール混合溶媒 (50% メタノール) を使用することにし、7 種の n-カルボン酸についてリーディングの pH (pH_L) を 4 点変化させて定性指標 (R_E) を実測し分離挙動について検討した。混合溶媒中での m_0 や pKa のわかっている試料はほとんどないため、 R_E の pH_L 依存性を解析して m_0 と pKa を決定した。さらに水、メタノール、およびそれらの混合溶媒における m_0 と pKa および分離挙動について比較検討したので報告する。

2. 実験 リーディング電解質としては、10 mM 過塩素酸にバッファーとして ϵ -アミノカプロン酸、ヒスチジン、トリエタノールアミン、トリスを 20 mM 加えて pH_L をそれぞれ 5.12, 5.50, 7.10, 7.87 に調製した系を使用した。ターミナル液は、10 mM ペラルゴン酸とリーディング電解質と同じバッファーイオン 20 mM から成り、試料としては、ギ酸、酢酸、プロピオン酸、酪酸、吉草酸、カプロン酸の 6 種を用いた。なお、酢酸及び過塩素酸の m_0 は、定量指標に対する m_0 の依存性の解析³⁾ と電導度測定の実験より求めた。装置は島津製細管式等速電気泳動装置 (IP-2A) を使用し、泳動電流は 50~100 μ A、泳動時間は 20~40 分であった。電解液の水分量は平沼水分計 (AQ101) で測定し、データ処理には、SORD (M223) 及び NEC (MS120) を使用した。

3. 結果と考察 リーディングの pH を 4 点変化させた時の実測の R_E 値を図-2 の黒丸に示す。

この実測値を最小 2 乗法を用いて解析することによって m_0 と pKa を求めた。図-1 水-メタノール混合系の誘電率と pKa

(1) 絶対移動度と pKa 図-3 は、7 種の n-カルボン酸を含む 9 種のイオンの m_0 の水分依存性を示している。例えば、ギ酸の m_0 ($\times 10^5$) は 水溶液系、50% メタノール系、純メタノール系ではそれぞれ 56.6, 32.0, 48.3 となり、50% メタノール中の m_0 は水溶液系やメタノール系の m_0 より小さくなっている。またどの系においても炭素数の順に n-カルボン酸の m_0 は低下している。0% と 100% メタノール系で大小関係が逆転する塩化物イオンと過塩素酸イオンの m_0 は、50% メタノール系ではほとんど同じであった。なお今回取り扱った試料の m_0 ($\times 10^5$) の範囲は、水溶液系では 31 (ペラルゴン酸) ~ 56 (ギ酸)、50% メタノール系で 20 ~ 32、純メタノール系では、37~48 であった。次に移動度を動的な立場から検討するために図-4 (a~c) にリーディングの pH に対する試料イオンの実効移動度をプロットしてみた。純メタノール系ではどの pH_L をとっても 3 (プロピオン酸), 4 (酪酸), 5 (吉草酸), 6 (カプロン酸) の試料の実効移動度にはあまり差がないが、水溶液系や 50% メタノール系ではそれらの実効移動度に違いがでてくることがわかる。また同じ pH_L での 50% メタノールと水溶液系の実効移動度を比較すると、水溶液系の約半分になっていることがわかる。さらに pKa は曲線の変曲点であるので、50% メタノールの pKa を他の系と比較すると、水溶液系より約 1 高く、純メタノール系より約 3 低い方にシフトすることがわかる。例えばギ酸の pKa は、水溶液系、50% メタノール系、純メタノール系ではそれぞれ 3.752, 4.40, 7.06 となった。なお今回取り扱った試料の pKa

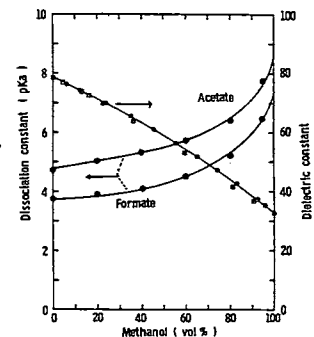


図-1 水-メタノール混合系の誘電率と pKa

図-2 50% Methanol. A graph showing the observed R_E value (y-axis, 0-10) versus pH_L (x-axis, 4-9). Multiple curves are shown for different ions: 1 Formate, 2 Acetate, 3 Propionate, 4 Butyrate, 5 Valerate, 6 Caproate, 7 Pelargonate. The curves show a minimum R_E value around $pH_L = 7$.

図-2 リーディングの pH 変化に対する実測 R_E 値

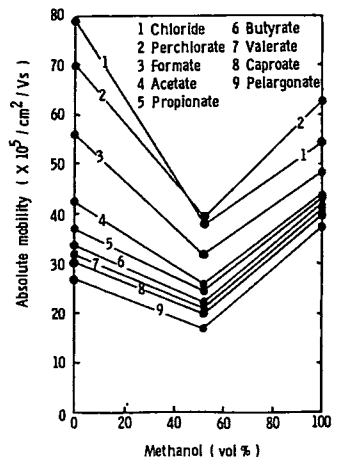


図-3 水-メタノール系の絶対移動度

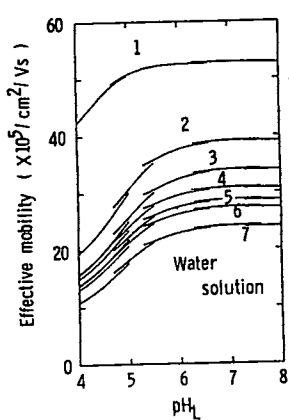


図-4-a

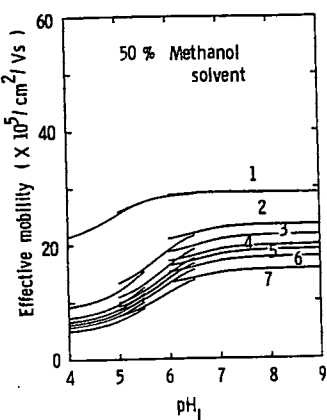


図-4-b

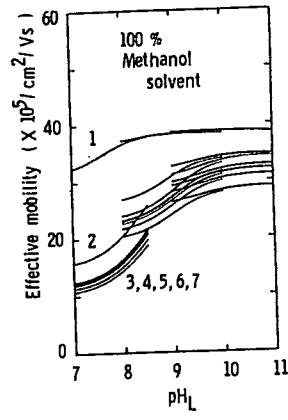


図-4-c

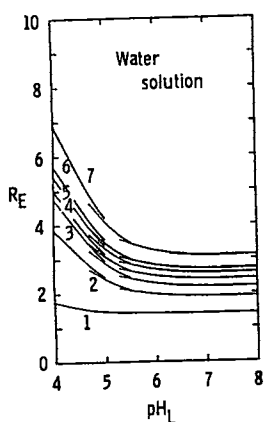


図-4-d

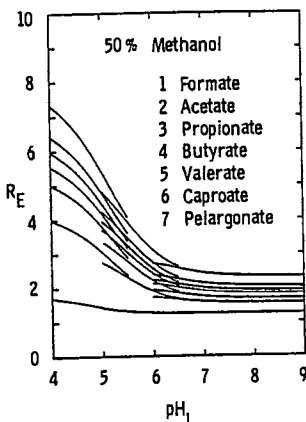


図-4-e

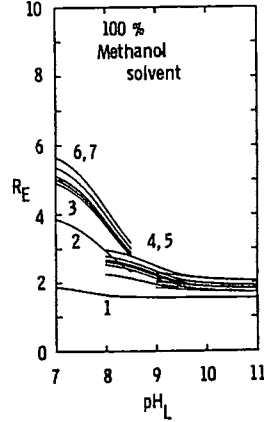


図-4-f

の範囲は、水溶液系では3.7(ギ酸)~5.0(ペラルゴン酸)50%メタノール系で4.4~5.9, 純メタノール系では7.1~8.8であった。

(2) 分離挙動の比較 これらの試料のメタノール濃度の違いによる分離の可否を検討するために図-4(d~f)にリーディングのpHとR_E値の関係を示した。同じpH_Lでの水溶液系と50%メタノール系のR_Eが似通っているのは、基準となるリーディングイオンの実効移動度の差異によるためである。これらの試料を分離するにはR_Eに適当な差が必要で、100%メタノールではどのpHをとっても分離困難だが、他の2つの系ではpH効果を利用すれば分離できそうである。(図-5-1), (図-5-3)及び(図-5-4)に50%メタノール系と水溶液系と純メタノール系におけるイソタコフェログラムのシミュレーションを示した。水溶液系同様50%メタノール系でも分離可能だが、メタノール系では分離困難なことがわかる。また50%メタノールpH_L=5.12

での実験結果を

図-5-2に示した。このように、今回求めたm₀やpK_aを使用すれば水溶液系やメタノール系と同様に50%メタノール系においてもイソタコフェログラムのシミュレーションや最適分離条件の設定等も理論的に取り扱える。

また、水溶液系に

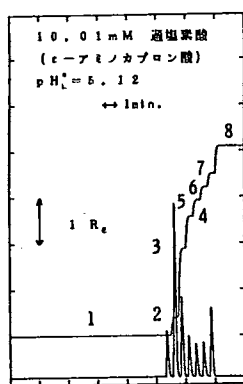


図-5-1

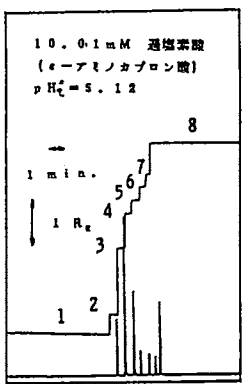


図-5-2

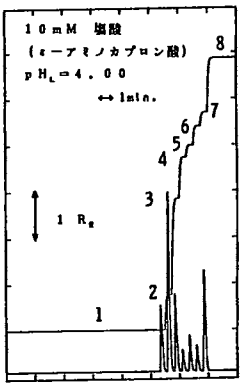


図-5-3

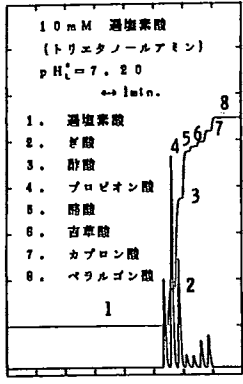


図-5-4

における定性・定量の指標の表⁴⁾と類似の表を50%メタノール等の水-非水混合溶媒系においても作成できれば、さらに広範囲における分離分析に役立つと考えられる。なお、m₀、pK_aの水分依存性および、その分離挙動をさらに明確にするため他の水分量についても検討を行っている。

参考文献

- 1) R. A. Robinson and R. H. Stokes. ELECTROLYTE SOLUTIONS (1951) 539. 541
- 2) 津吉 徹, 広川 健, 木曾 義之: 第3回等速電気泳動シンポジウム, (1983)
- 3) T. HIROKAWA AND Y. KISO: J. Chromatogr. . 260 (1983) 225
- 4) T. HIROKAWA AND Y. KISO: J. Chromatogr. . 271 (1983) D1

1. 諸言

(九大工) 藤野泰光・早下隆士・高木 誠
(熊工大) 田崎正人

3 等速電気泳動法に於ける中性配位子の利用

細管式等速電気泳動法(IP法)は、基本的な種々のイオンをその移動度の差を利用して分離する手法である。従って、各分析対象イオンの移動度が同等あるいは近いに於ける重要な場合は分離が不可能であり、分析イオンの移動度を制御することから分離に於ける重要な因子となる。我々は先に、分析イオンの実効移動度を制御する目的をもち、分析イオンとの相互作用が期待される中性配位子を系に添加する方法を提案した。本研究では、従来の方法では相互分離が困難である構造型異性体、あるいは類似構造型の有機イオンの分離に中性配位子を添加することにより、(CD)を応用し、その挙動について検討を行った。

2. 理論

中性配位子存在下に於ける陽イオンA⁺、B⁺の泳動を図1に示した。A⁺、B⁺のそれぞれ水の結合定数をK_{AN}、K_{BN}とすると

$$K_{AN} = \frac{[A^+][N]}{[AN^+]}$$

$$K_{BN} = \frac{[B^+][N]}{[BN^+]}$$

従って、各イオンの実効移動度は

$$m_A = \frac{m_A + m_{AN}[N]A}{1 + K_{AN}[N]A}$$

$$m_B = \frac{m_B + m_{BN}[N]B}{1 + K_{BN}[N]B}$$

(3)式からわかる様に、A⁺、B⁺が同程度の移動度(m_A=m_B)であつてb、中性配位子Nとの相互作用が異なれば、それぞれの実効移動度に差が生じ(m_A≠m_B)、相互分離が可能となる。また、配位子の添加量とそれぞれイオンの移動度変化の関係を調べることにより、その結合定数の程度を上げることが可能である。

3. 実験

1-1イオン液に1%濃度のα-CD及び0.01% PVAを含む10mM酢酸-酢酸カリウム水溶液を、9-ミナル液に5mMのα-74アルブミン塩酸塩を用い、IP2A(0.5mm ID × 150mm, PGD)により25℃、50μAで分析した。試料の実効移動度j、M_A、L_iを内部基準として電位勾配の逆数から求めた。

4. 結果及び考察

図2,3にα-3クロキスアリニを添加した際の各種イオンの移動度変化を示した。四級アモニウム塩では酸解離変化が大きいので、pHによる移動度を制御することによって、分子量が主な移動度を決定する因子となる。ところが、この様な系に中性配位子であるα-3クロキスアリニを添加することにより、移動度を大きく変化させることが可能である。これは、α-3クロキスアリニの有する空洞が各種有機塩に対して特異的な取り込みを行うことによる。図2に示す様に、この相互作用はβラクトン構造の順に大きくなり、この為α-CD無添加の系では分離不可能である。構造異性体を容易に分離することができた。図3に示すα-置換体にも見られた。α-置換体では、β-置換体よりも移動度の挙動が、図3に示すα-置換体にも見られた。

モニウム基に対して、オルト-パラ置換体が最も相互作用が大ききことがわかる。

α -CD 希加に対する実効移動度変化を解析することにより、結合定数の算出が可能である。等速電気泳動の平衡条件及びゾーン界面での物質収支より(5)式の関係が得られる。(5)式から $[N]_A$ を算出し、(3)式に代入することにより、各 K_{AN} 値に対する移動度変化をシミュミレーションすることができ(図4)。図に示す様に、各 α -CD

濃度に於ける移動度が横軸と垂直値の刺定値のプロットを示した。 α -CD 濃度の低い条件で移動度のばらつきが見られた。しかしながら、一般に $\log K_{AN}$ 値が 2 以下のイオンに対する結合定数の刺定は難しく、結合定数などの程度の値を示すか評価する場合、IP法は充分有効な手法と考えられる。

$$m\bar{M} \cdot K_{AN}^2 [N]_A^2 + (m\bar{M} + m\bar{A}N - C_{M/L} \cdot m\bar{A}N \cdot K_{AN}) K_{AN} [N]_A^2 + \{m\bar{M} + (m\bar{A} - m\bar{A}N) K_{AN} C_L\} m\bar{M}^2 / m_L - C_{M/L} \cdot K_{AN} (m\bar{M} + m\bar{A}N) \} [N]_A - C_{M/L} \cdot m\bar{M} = 0$$

但し、 $m\bar{M} = m\bar{M} + mQ$ ($i = L, A, AN$)

(5)

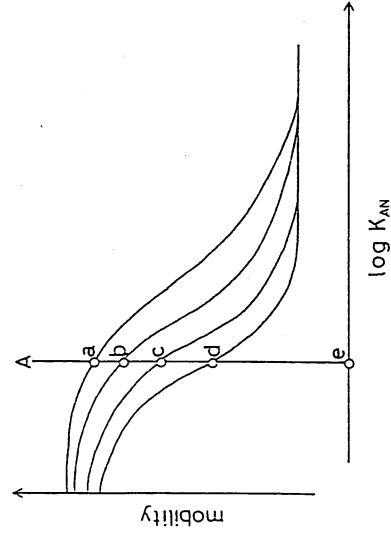


図4 移動度と結合定数の関係

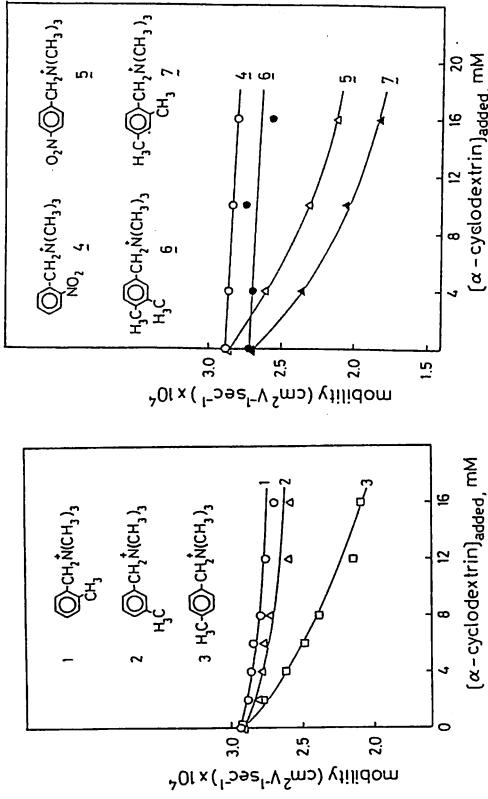


図2. オルト, メタ, パラ異性体の移動特性 図3. 各種有機カチオンの移動特性

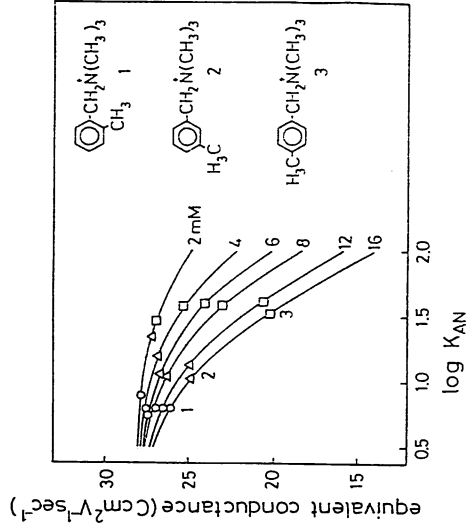
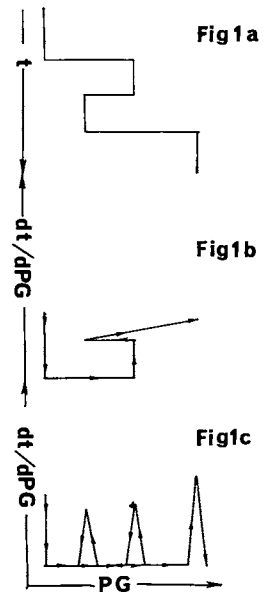


図5 オルト, メタ, パラ異性体の結合定数

4 PG微分法によるアミノ酸およびペプチドの
等速電気泳動図のマイコンによる処理法
(城西大・理・化)

○小林 英三郎

前回の細管式等速電気泳動分析シミュレーション¹⁾において、従来のイソタコフログラムに代り dt/dPG 値を PG 値に対してプロットするクロマトグラムを用いる事を提案した。この方法は電位こう配の歪みをマイコンで処理し、得られる波型を一般のクロマトグラムと同様な解析ができる事を示したものである。しかしながらこの処理方法は理想的なゾーン形成からずれる "enforced zone" 又はドリフトによる電位こう配の減少には対処してない。今回はこの電位こう配が減少したゾーンに対する "Tracking slice" 処理、ゾーン形成が不完全な信号の処理、および微分中 (ΔPG) の設定方法について、アミノ酸およびペプチドのイソタコフログラムを用いて検討する。また最近 REIJENGA²⁾ らは筆者と同様な考え方に基く信号処理法について報告しているが、本方法と彼らの方法との相異点についても述べる。

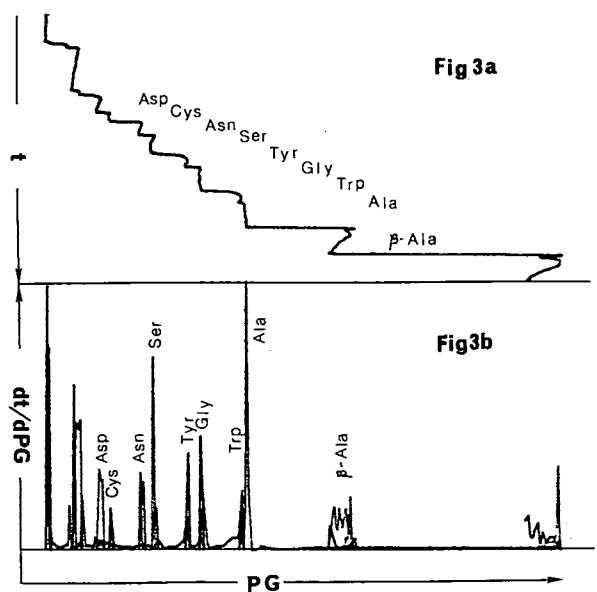
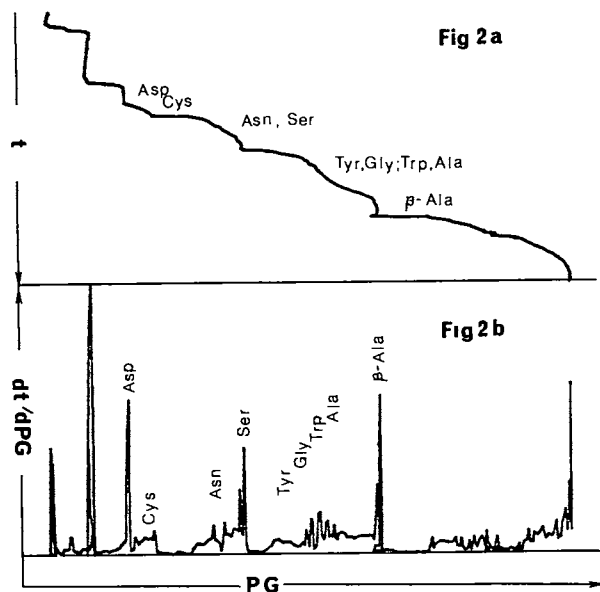


I. 使用システム：前回報告したシステムのクロマトパック (CR2AX) とマイコン (PC8801mkII) を RS-232C 回線で結び信号処理をした。さらに概に報告されているイソタコフログラムを評価するためにデジタルタイガーを用いた。

II. アミノ酸およびペプチドの分析条件：日根³⁾が報告している分析法に基いた。

装置 島津細管式等速電気泳動装置 IP-2A 型、泳動チューブ 10cm (内径 1mm) と 15cm (内径 0.5mm)、電流値；250 μ A, 9min 通電後、100 μ A にて分析、リーディング電解液；10mM HCl, Amediol, pH 8.8, ターミナル電解液；10mM E-Amino Caproic Acid, Ba(OH)₂, pH 10.8, 両電解液に粘性剤としてヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) を 0.1% 溶解。

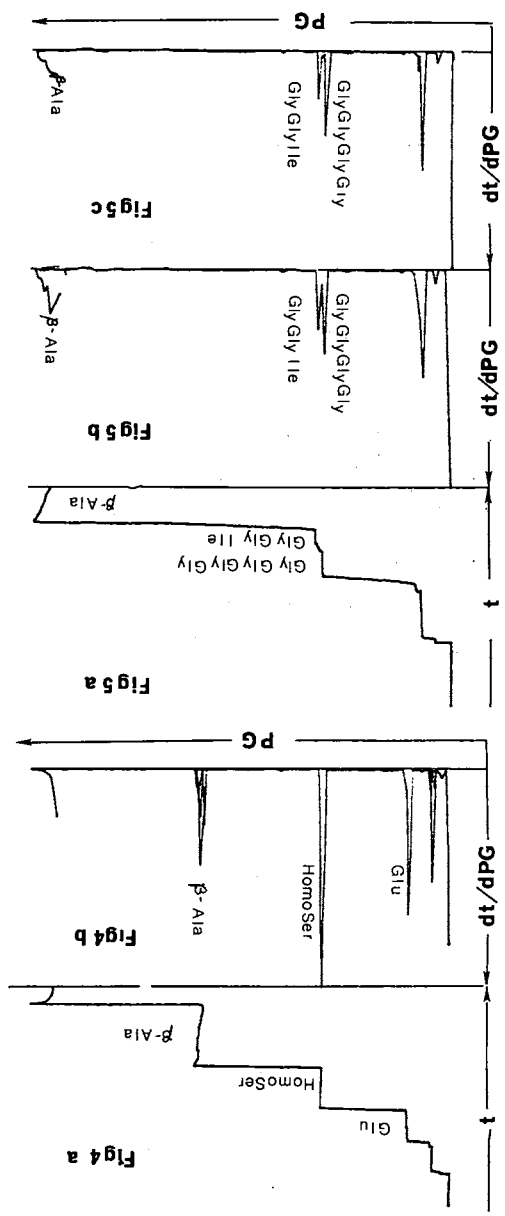
[結果] 1. PG 値が減少した場合の "tracking and slice" による波型処理；Fig 1a で示した "enforced zone" は通常の微分処理では Fig 1b に示したようにクロマトグラムとし



この判断が困難になる。これに対処するため本方法はPG値の増減方向を取扱った
 "tracking and slice" とおもうべき処理を行った。Fig 1c に示したように各成分
 の分離が明確になり、成分の定量も容易となる。以下の結果は全てこの処理として
 (2) Fig 2a, Fig 3a は日根³⁾が報告したアミノ酸のイソプロピルアミンを標準として
 用いたイソプロピルアミンを20%溶解したものであり、この形成は不完全である。これ
 をdf/dt/PG として示した。Fig 2b である。(微分ΔPGはγ-アミノ酪氨酸を標準とし
 たものPG値として示す) Fig 2b である。このPG値の増減方向が見られる。これらのPG値
 が減少する。γ-アミノ酪氨酸は微分処理により、多重した中
 11c-1) を示す (Fig 3b)。このPG値の場合には、
 1) 処理およびΔPG値の設定により単成分として処理す
 る。4. 通常の液体クロマトグラフィーによるGlu, Homo
 Ser の分離は不完全である。このアミノ酸試料にβ-Ala
 を加え分析。微分処理したものをFig 4 に示す。Glu
 とHomoSer の分離は十分であり、β-Ala の面積からその
 成分の定量を行おう事ができる。5. Fig 5a はβ-Ala と
 (gly-gly-ile) とアミノ酸 (gly-gly-gly) を分析し
 たものである。分子量がほぼ同一である両アミノ酸は
 このために分離係数はPG値が接近しており、5b
 で示すようにΔPGを0.2%と設定したものは分離不
 十分であるが、ΔPGを0.08%として処理した場合5c に示
 すように移行過程が両アミノ酸の間で存在するものと
 して両成分の定量が可能となる。

結果を示したように、PG値の減少は数多くの成分
 によって認められる。本報告では理想的なγ-アミノ酪氨酸
 でのPG値の減少は、不完全なγ-アミノ酪氨酸の形成、物
 行過程にも対応できる "tracking and slice" 処理
 をする事により、詳細な解析を可能とする事を実現
 した。REITENGA²⁾の処理方法は理想的なγ-アミノ酪氨酸
 成分が成立するものを対象とし、"enforced zone" による
 "Backstep" を "normal zone" と同様に処理している。
 またPG値をγ-アミノ酪氨酸、γ-アミノ酪氨酸の固定した
 信号として処理している。PG値測定の変動度に依存性が高いものであり、ここで
 述べたPG値はγ-アミノ酪氨酸、移行過程の処理方法については検討されていない。

1) 小林英三郎、水田細管、等速電気泳動分析の標準化 (1983) 2) 日根隆、水田細管、等速電気泳動分析の標準化 (1984) 217-216
 3) J.C. REITENGA et al, J. Chromatogr. 292 (1984) 217-216



6 界面動電現象を利用した液体クロマトグラフィー

(京大工) ○大塚 浩二・寺部 茂・安藤 貞一

(緒言)

毛細管内にイオン性界面活性剤溶液を満ちし、その両端間に直流電圧を印加すると、溶液は電気浸透によって移動するが、界面活性剤ミセルは電気泳動効果を受け水相とは異なった速度で移動する。毛細管の一端に溶質を注入すると、Fig. 1に示すように、溶質はミセル可溶化現象によって水相とミセル相とに分配されるので、クロマトグラフィー条件が成立する。ミセルは、平衡状態でしか存在しない pseudophase であるが、本法は液-液分配クロマトグラフィーの一種と行うことができる。我々は本手法を「ミセル可溶化クロマトグラフィー」と称し、基礎的な検討を行なってきた。¹⁾ここでは、本系における界面動電移動現象についての検討結果を報告する。

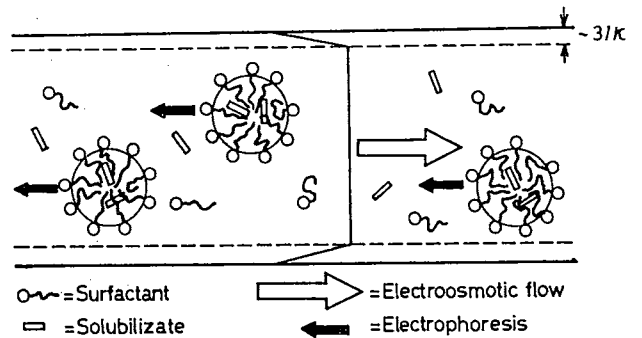


Fig. 1. Schematic illustration of micellar solubilization chromatography.

(実験)

毛細管には、主に内径 50 μm 、長さ 65 cm のフューズドシリカ管を使用し、溶離端から 15 cm の所で被覆樹脂を一部取り除いて、その部分で 50 $\mu\text{m} \times 0.7 \text{ mm}$ のスリットを通しオンカラム法で UV 吸収を測定した。分離用溶液としては、主に硫酸ドデシルナトリウム (SDS) をリン酸塩-ホウ酸塩緩衝液 (pH 7.0) に溶解したものをを用いた。実験は、通常 35 $^{\circ}\text{C}$ に設定した空気恒温槽内で行なった。

(結果・考察)

Fig. 2 にミセル可溶化クロマトグラムの一例を示す。ここで、メタノールはミセルに全く可溶化されず水相の動きを、Sudan III は完全にミセルに可溶化されミセルの動きを示すと考える。

毛細管内における電気浸透流は、電気二重層の厚さ $1/\kappa$ が管内径 r に比べて充分小さい場合には、ほぼ栓流とみなすことができ、その速度 v_{eo} は

$$v_{eo} = -(\epsilon\zeta/\eta) E \quad (1)$$

で表わされる。ここで、 ϵ 、 ζ 、 η 、 E はそれぞれ液体の誘電率、ゼータ電位、粘度、電場の強さである。(1) 式から、 v_{eo} は印加電圧 V に比例すると考えられるが、Fig. 3 に示すように実験結果では、 V が増大するにつれて v_{eo} の増加の割合が大きくなった。これに対して、 v_{eo} と電流 I との間には常に直線関係が認められた。 E と I との関係は、Ohm の法則を用いて (2) 式のように書ける。

$$E = \{1/(\pi r^2 \sigma)\} I \quad (2)$$

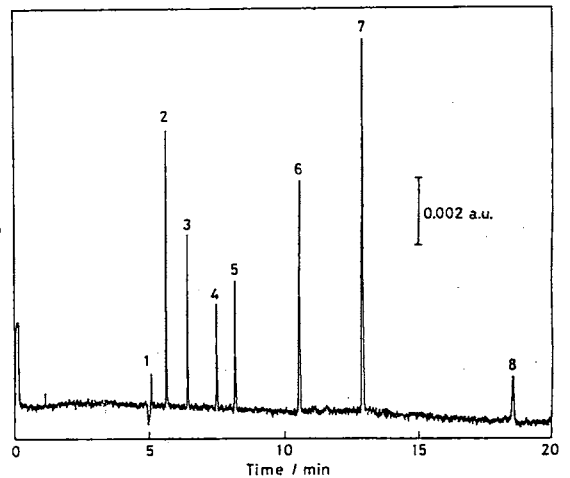


Fig. 2. Micellar solubilization chromatogram of a test mixture: (1) methanol, (2) resorcinol, (3) phenol, (4) *p*-nitroaniline, (5) nitrobenzene, (6) toluene, (7) 2-naphthol, (8) Sudan III.

ここで、 l は毛細管の長さ、 σ は溶液の比誘電率である。 σ は、Kohlrausch の法則によって

$$\sigma = \sum_j c_j z_j \lambda_j \quad (3)$$

である。ここで、 c_j 、 z_j 、 λ_j はそれぞれ、 j 番目のイオンに対する単位体積当りのモル数、電荷数、当量導電率である。 λ_j は、Stokes-Einstein および Nernst-Einstein の関係を用いて

$$\lambda_j = \frac{z_j e F}{6 \pi a_j \eta} \quad (4)$$

と表わされる、ここで、 e は電子の電荷、 F はファラデー定数、 a_j は j 番目のイオンの半径である。(1), (2), (3), (4) 式から次式が得られる。

$$v_{eo} = -\frac{6 \epsilon \zeta l}{r^2 e F} \sum_j \frac{a_j}{c_j z_j^2} I \quad (5)$$

(1) 式と (5) 式との相違は、 η が含まれるか否かであり、 v_{eo} と E との直線関係からのずれの原因は、電圧印加によって発生したジュール熱

のために液温が上昇し、粘度が低下したためであると考えられる。実際に毛細管外壁の温度を測定したところ、0.05 M SDS, $E = 410$ V/cm で周囲の気温よりも 45°C 程度の上昇が見られた。また、 V と I との間にも直線関係は成立しなかったが、これも液温上昇による η の減少から説明できる。

ミセルの移動速度 v_{mc} は、流れの向きの符号を考慮して、 $v_{mc} = v_{eo} + v_{ep}$ と表わせる。ここで、 v_{ep} はミセルの電気泳動速度で、次式で与えられる。

$$v_{ep} = \frac{2 \epsilon \zeta}{3 \eta} f(ka) E \quad (6)$$

ここで、 $f(ka)$ は粒子の形の関数で $ka = \infty$ に対して 1.50 である。なお、(6) 式の ζ はミセルの値であり、(1) 式の ζ はフューズドシリカ管内壁の値である。(1), (6) 式を用いて

$$v_{mc} = -\frac{E}{\eta} \left\{ \zeta_1 - \frac{2}{3} \zeta_2 f(ka) \right\} \quad (7)$$

と書ける。ここで添字 1、2 はそれぞれフューズドシリカ、ミセルを表わす。メタノールのバンドが陽極側から陰極側へ移動することから、 ζ_1 の符号は負である。また Sudan III のバンド、即ちミセルの移動速度がメタノールと同じ向きでその大きさはより小さいこと、負電荷をもつ SDS ミセルの ζ_2 は負の値をとることから、 ζ_2 の絶対値は ζ_1 のそれより小さいことになる。

v_{eo} は、一定電場では界面活性剤濃度によらずほぼ一定の値をとったが、 v_{mc} は濃度の上昇とともに減少した。濃度が高くなるにつれて I の値は増大し、それによる液温上昇から η の減少が起ることから、これらの現象を説明することができる。

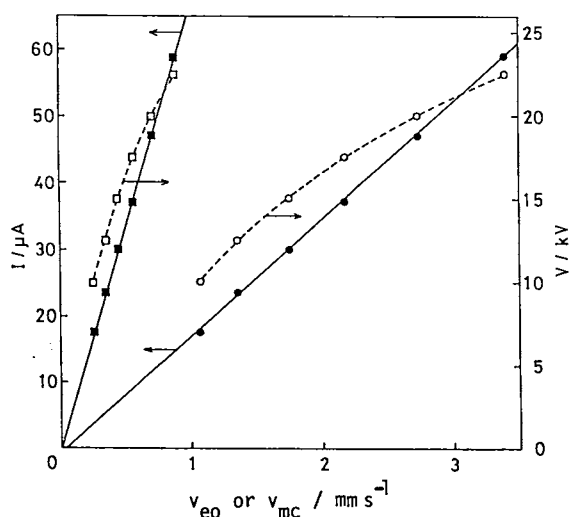


Fig. 3. Dependence of migration velocities of methanol (v_{eo} ; O, ●) and Sudan III (v_{mc} ; □, ■) on applied voltage and current.

0.05 M SDS, pH 7.0; 0.05 mm i.d. x 500 mm; 35°C .

1) S. Terabe, K. Otsuka, K. Ichikawa, A. Tsuchiya and T. Ando: Anal. Chem., 56, 111 (1984).

7 植物色素アントシアニン類の細管式等速電気泳動について

(ひろおが あら)

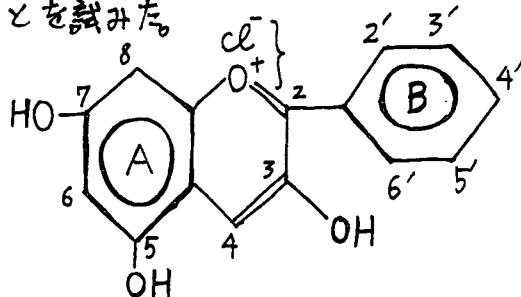
(よしたま くにじろう)

○平岡 厚 (杏林大・保健), 吉玉 国二郎 (信州大・理・生物)

アントシアニンは、高等植物の花弁や果実、茎などに分布し、その赤色から紫色、青色にかけての色調の母体となる色素である。それらは、植物体内では、通常水溶性の配糖体となり、液胞内に溶けて存在している。糖のはずれたアグリコンのアントシアニジンは、3,5,7-trihydroxy-2-phenylbenzopyryliumの骨格を持ち、広義のフラボノイドに属している。各アントシアニンの化学構造と物理常数は、母核フェニル基(右側のB-ring)におけるOH基やOCH₃基の数と位置、OH基にグリコシド結合する糖の種類と結合パターン等により決定される。これらの化合物は、それを含む植物試料を、塩酸性メタノール(通常0.5~1% HCl-CH₃OH)で処理することにより、安定な塩酸塩(Fig. 1)として容易に抽出される。そのようにして得られた色素抽出液は、ふつう数種類のアントシアニンを含んでいる。それらの分離・分析には、かつては、3紙電気泳動も用いられていたが、時間がかかり過ぎる等の欠点の為、PC, TLCの発達と共にあまり用いられなくなって来ている。しかし近年、電荷を持つ低分子物質の迅速で再現性のある分析手段として、等速電気泳動法が注目されるようになって来た。そこで我々は、アントシアニン類の分離にそれを利用することを試みた。

Fig. 1.

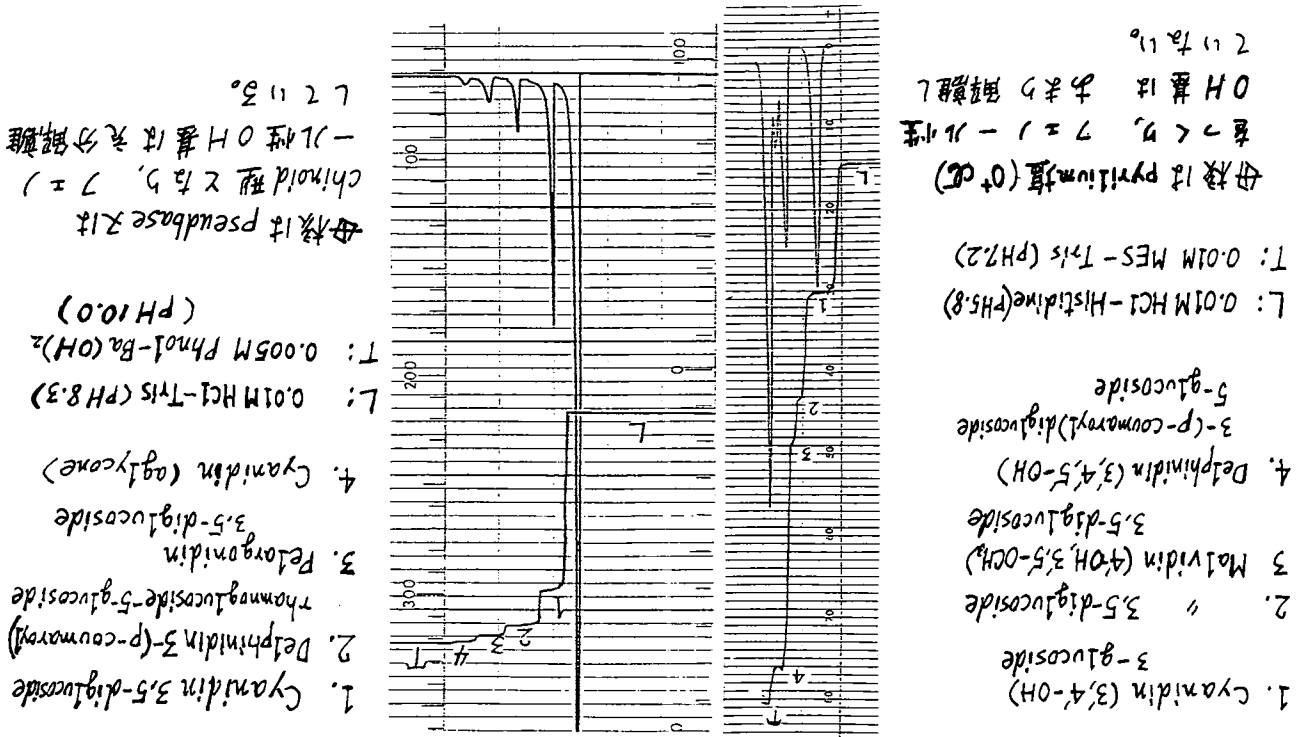
Structures of Anthocyanins (chlorides)



- 4'-OH Pelargonidin (ペラルゴニジン)
- 3',4'-OH Cyanidin (シアニジン)
- 3',4',5'-OH Delphinidin (デルフィニジン)
- 4'-OH, 3',5'-OCH₃ Malvidin (マルヴィジン)
- 4'-OH, 3'-OCH₃ Peonidin (ペオニジン)
- 4',5'-OH, 3'-OCH₃ Petunidin (ペツニジン)
- 4'-OH, 3',5',7'-OCH₃ Hilstidin (ヒルスチジン)

材料として、塩酸塩の形で結晶化させられているペラルゴニジン、シアニジン及びそれらの配糖体数種(3-glucoside, 3-rhamnoglucoside, 3,5-diglucoside等)等のアントシアニン標品及び成分既知の植物試料(シアニジンの3-glucoside及び3-rhamnoglucosideを含むイタドリ茎及びペラルゴニジンとシアニジンの各3,5-diglucosideを含むバラ花弁など)の色素抽出液を減圧乾固したものを、HClを0.01M含む先行液に溶解した液を使用し、先行液(L)と終局液(T)の適当な組み合わせ(例① L: 0.01M HCl-tris pH 8.3, T: 0.005M Phenol-Ba(OH)₂ pH 10.0, ② L: 0.01M HCl-histidine pH 5.8, T: 0.01M MES-tris pH 7.2等)の下で、PGD and/or UVDにより検出した。得られた isotachopherogram (Fig. 2) は、化学構造の微妙に異なるアントシアニン類(クロライド)の分離の成功を示し、又、plant extract中の物質も、標品との混合液をinjectした場合のゾーンの長さの増加により同定された。各物質のPU値の大小関係は、分子量の差異の他、溶媒のpHによる母核の化学構造やフェノール性OHの解離状態の微妙な変化をも反映して、分析系により若干の違いがあったが、T液にPhenol-Ba(OH)₂系を用いた場合にシアニジン(アグリコンのみ)がTと同じになることを除き法則的であった。以上の結果より、細管式等速電気泳動法は、アントシアニン類を分離・同定することにおいて、PC, TLCと共に有効な手段であると充分言い得ると考えられる。

Fig. 2. Isoachropherograms of Anthocyanins



母核は pseudobase 又は
 chiroid 型となり, 7 =)
 -1,2 性 OH 基は充分解離
 L 21130.

母核は pseudobase 又は
 chiroid 型となり, 7 =)
 -1,2 性 OH 基は充分解離
 L 21130.

母核は pseudobase 又は
 chiroid 型となり, 7 =)
 -1,2 性 OH 基は充分解離
 L 21130.

母核は pseudobase 又は
 chiroid 型となり, 7 =)
 -1,2 性 OH 基は充分解離
 L 21130.

母核は pyrimidium (0+2C)
 となり, 7 = 1 - 1,2 性
 OH 基は 未だ解離し
 ないから.

母核は pyrimidium (0+2C)
 となり, 7 = 1 - 1,2 性
 OH 基は 未だ解離し
 ないから.

母核は pyrimidium (0+2C)
 となり, 7 = 1 - 1,2 性
 OH 基は 未だ解離し
 ないから.

母核は pyrimidium (0+2C)
 となり, 7 = 1 - 1,2 性
 OH 基は 未だ解離し
 ないから.

L: 0.01M HCl-Tris (PH 8.3)
 T: 0.005M Phol-Ba(OH)₂
 (PH 10.0)

L: 0.01M HCl-Histidine (PH 5.8)
 T: 0.01M MES-Tris (PH 7.2)

1. Cyanidin 3,5-diglucoside
2. Delphinidin 3-(p-coumaroyl) diglucoside
3. Pelargonidin 3,5-diglucoside
4. Cyanidin (aglycone)

1. Cyanidin (3,4'-OH) 3-glucoside
2. Malvidin (4'OH, 3,5-OCH₃) 3,5-diglucoside
3. Delphinidin (3,4',5-OH) 3-(p-coumaroyl) diglucoside
4. 5-glucoside

○平岡厚 (杏林大・保健)
 (右) 吉至 (信州大・理・生物)

植物色素の細管式等速電気泳動による

3.1 劣化生成物検出方法の検討 試料の新油と廢油を7・79・11で50倍に希釈して装置に導入すると、どちらともほぼ同様の電気泳動図が得られる。次に試料を7・70・11で50倍に希釈して装置に導入したところ廢油から、新油より明らかにUV吸収の大きい電解質を検出することができた。これはのこから潤滑油には多量の電解質が溶解している事、廢油には微量であるが新油には劣化する物質(劣化生成物)が存在する事、適当な処理をするにLに5, 7とこれらの物質を電気泳動法(IP法)で検出できる事等がわかった。次に試料中に溶解している電解質の一部を水に抽出し、新油と廢油の相違をIP法で調べる方法について検討した。試料に5倍量の10mmM水酸化ナトリウムを加えて振とうし、静置後水層の一部を装置に導入した。(以下7・11カリ処理という) その結果

3 実験及び結果

た。

2.3 試料 カリウムイオン自動専用潤滑油(新油)と使用油(廢油)を同い、添加剤(粘度指数向上剤、清浄分散剤、酸化防止剤)は基油に適宜の混合率に調整して試料として70℃酸をも同い、適宜の電解液を調整した。
 4でpH 9.5に調整して用いた。この電解液系その他、必要に応じてトリブ、6-73) Lトリブ > X-100を0.1%添加した。また9-37 L液は5mmM β-73ニを水酸化カリウムで調整

2.2 試薬 電解液は0.1Nナトリウム塩酸を7.5mmM塩酸を7.5mmMに調整槽は25℃に設定した。
 4cm内径0.5mm、長さ10cmを直列に連結した。泳動電流は30~150mAで調整し、恒温

2 装置、試薬

2.1 装置 細管式等速電気泳動分析装置(島津IP-2A型)を用い、検出は電位勾配検出器(PGD)及び紫外線吸収検出器(UVD, 254nm)を用いた。泳動管は内径1mm、長さ4cmに設定した。
 2 装置、試薬
 剤の劣化等について同法を用いて検討した。
 電気泳動法で検出する方法について検討すると共に、酸化劣化試験による潤滑油及び添加成分の劣化等も多し。そこで我々は一つの試みとして潤滑油の劣化に伴う変化と等速生成等が知られてくる。これらの変化過程は複雑であり、種々の研究がなされてくるが、明によるカルボニル化合物の生成、ニトロ化による硝酸エステル生成、親水性物質の長期間の使用によりアミンやラジカル生成し、塩基価や粘度の低下現象が起る。酸化劣化入、基油及び添加剤の物理的、化学的劣化等により劣化するを考慮されている。例えば種類、運転方法も異なる事等によるものと見られる。潤滑油は燃焼過程で生じる物質の混入は容易には決められない。これは現在使用されている潤滑油の種類が多し、工業上の潤滑油の劣化に対する評価方法として、この試験が最適方法であるかという点から検討、酸価、金属含量等の検査や入って分析が行われている。これは格で行われている。現在潤滑油の性能の評価方法として、外觀、臭い、水分、粘度、多い。ただし交換時期はメーカーにより意見が異なり、必ずしも統一された規

1 緒言

自動車用潤滑油は厳しい条件下で使用されるため、定期的に全量交換されることが多い。したがって交換時期はメーカーにより意見が異なり、必ずしも統一された規格で行われている。現在潤滑油の性能の評価方法として、外觀、臭い、水分、粘度、酸価不溶分、酸価、塩基価、金属含量等の検査や入って分析が行われている。これは容易には決められない。これは現在使用されている潤滑油の種類が多し、工業上の潤滑油の劣化に対する評価方法として、この試験が最適方法であるかという点から検討、酸価、金属含量等の検査や入って分析が行われている。これは格で行われている。現在潤滑油の性能の評価方法として、外觀、臭い、水分、粘度、多い。ただし交換時期はメーカーにより意見が異なり、必ずしも統一された規

神奈川工試 都立大・理
 村井省二 奥山興生
 千葉彰三 山口明広

（株）島津製作所 応用技術部

ヒネ ガシ
日根 隆

1. はじめに

第四級アンモニウム塩系除草剤の一種であるパラコート（1,1'-ジメチル-4,4'ジピリジニウム塩）は即効性が高いうえに、土壤に接触すると直ちに吸着固定されて不活性化され、土壤を介して植物の根、茎葉等に害を及ぼさないというすぐれた性質を持っているため、近年盛んに使用されている農薬である。しかしその反面、散布時の中毒や服毒による事故も数多く報告されている。このパラコートは無色、無臭で、水に可溶であるが主な有機溶媒には不溶である。このため分析は抽出等が困難で夾雑成分の影響を受けやすい。パラコートは、一般にアルカリ性におけるヒドロサルファイトナトリウムの青色発色により定性分析が行われているが、定量分析には更に複雑な操作を要している。今回、細管式等速電気泳動法（イソタコ法）により前処理することなく試料中のパラコートを直接分析することを目的とし、検討を行った。

2. 実 験

装置は島津細管式等速電気泳動分析装置：IP-2Aを使用した。検出器は紫外線吸収検出器（UVD：254nm）と電位勾配検出器（PGD）とを直列に接続して用いた。泳動チューブは内径1.0mm長さ4～20cm（PTFE製）と、内径0.5mm長さ15cm（FEP製）を直列に接続し、泳動電流は100～250 μ Aで10～18分間通電させた後に100 μ Aに下げて分析を行った。検討した電解液の組み合わせは、一般に陽イオン分析に使用されているものを選択し、それらを表1に示した。定量は精度を高めるために、島津データ処理装置：C-R2Aを用いてUVDの信号の面積を測定し、パラコートの分析を行った。その一例を図1に示す。試料はコントロール血清、尿等にパラコートを添加したものをを用いた。

3. 結 果

表1に示した電解液の組み合わせの中で、条件Iはリーディングイオンであるカリウムイオンとパラコートの易動度が接近しており十分な分離が得られなかった。条件II、IIIのいずれの場合も他の陽イオンの影響を受けることなくパラコートを分離することができ、しかもリーディング電解液中でタンパクが変性するために、血清等の試料も除タンパク操

表1 電解液の組み合わせ

ELECTROLYTE SYSTEM	I	II	III
Leading electrolyte			
leading ion	Potassium ion	Hydrogen ion	Hydrogen ion
concentration	10mM	10mM	10mM
counter ion	Acetate ion	Chloride ion	Chloride ion
pH	5.0	—	—
additive	—	0.1% PVA	30% Glycerine
solvent	Distilled water	Distilled water	Methanol
Terminating electrolyte			
terminating ion	Carnitine	Tris	Tris
concentration	10mM	10mM	10mM
counter ion	Chloride ion	—	—
additive	—	—	30% Glycerine
solvent	Distilled water	Distilled water	Methanol

作をせずに直接試料を分析することができた。しかし、条件Ⅲでは溶媒がメタノールであるため、あまり泳動チューブを長くしたり、泳動電流を大きくして分析時間を短くすることなどの操作が困難で、満足すべき結果が得られないことがあった。従って条件Ⅱで実験を行った。この時、リーディング電解液にPVA（ポリビニルアルコール）の添加の有無による差異を検討したところ、添加した方が良好な結果が得られた。図2に血清中のパラコート濃度が50 ppmである試料を3 μ l 直接注入し、分析した結果を示す。また、血清中に添加したパラコートの回収率は95%以上であった。しかし、試料を5 μ l 以上注入すると著しく定量性が低下した。これは血清中に含まれるナトリウムイオン、カリウムイオン等により分離が妨げられたり、タンパクと共沈等を起こし濃度が低くなるためと考えられる。血清中のパラコートは、泳動チューブを20 cmにすることにより夾雑成分の妨害を受けることなく、10 ppm 以下まで十分に検出することができた。しかし、尿中のパラコートは共存する陽イオン、特にカリウムイオンの影響で、分離が妨げられ血清よりも検出限界が低下した。

《参考文献》

- 1) 第1回パラコート中毒症研究会報告(1979)
- 2) E.Kenndler & D.Kaniansky, J.Chromatogr., 209 306-309 (1981)

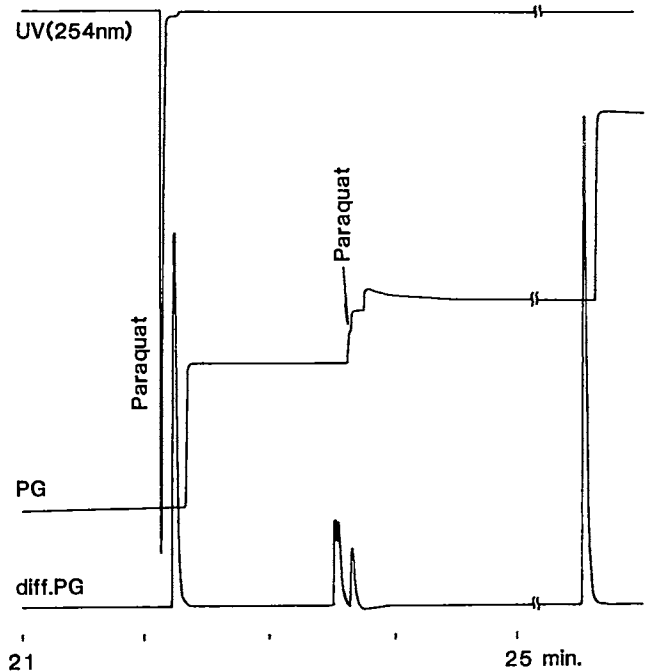
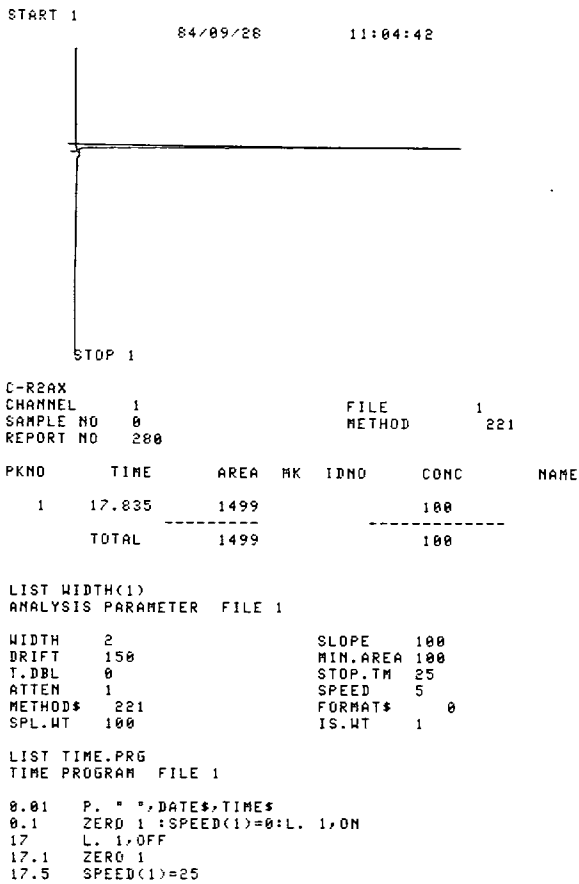


図1 C-R2Aによるパラコートの定量

図2 血清中のパラコートの分析例

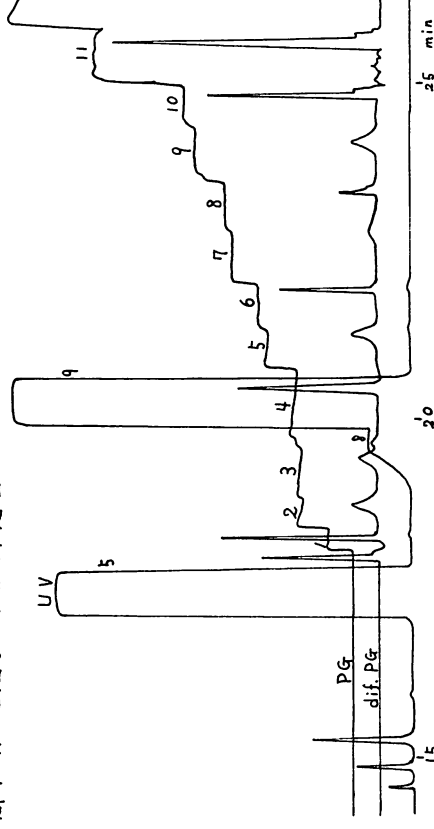
細管式等速電気泳動法の医薬品成分への応用
第2報 製剤中のアミノ酸の分析

(徳島文理大・薬) ○香西重忠 ・ 赤田良信
(島津製作所・応用技術部) 八木彦夫

〔目的〕分離分析法の一種である細管式等速電気泳動法(イソタコフエリシス)は、高速液体クロマトグラフィ、一等級と比べ高価な分離管を必要とせず、その操作も簡便で再現性も良好であり、特にイオニン性化合物のすぐれた成分法と考之られるが、その反面、感度たついたり若干の難点を残してあり、代謝物や生体試料の分析法としては、改良の余地がある。しかし、特別な前処理の必要もなくまた、分離管の経時変化による分離状態の変動も少ないので、成分対象成分が比較的多数に含まれている製剤等の品質管理のための成分法として特に有効な手段と考之られる。従って、本法による市販製剤中のパントテン酸、アスコルビン酸、安息香酸、コンドロイチン硫酸、クエン酸、リンゴ酸、D-グルクロン酸、P-アミノサリチル酸、DL-アスパラギン酸、コハク酸及びL-グルタミン酸の同時定量を行うための基礎的條件の検討を目的とした。

〔実験〕装置：島津細管式等速電気泳動装置(IP-2A型)。電位勾配検出器：PGD-2型、紫外吸光検出器：UVD-10型。泳動電流：250 μ A(9 min)→100 μ A。キャート速度：30~60 mm/min。電解液：リ-デ-ンゲ液—0.05% HEC 水溶液に10 mM と12 mM と異なるように塩酸とア-ア-を溶解した。ターミナル液—10 mM のカプロン酸ナトリウム水溶液。試料：市販の製剤各14種を用いた。試料液の調製：ドリ-ンク剤はそのまま、また錠剤及び顆粒剤はその一定量を正確に量り、水を抽出溶媒とし、超音波処理を行った。15回転で2分間遠心分離し、得られた上澄液を試料液とした。

〔結果及び考察〕リ-デ-ンゲ液中の粘性剤、pH及び塩酸濃度等の検討を行い、上記11種の各イオニの一意成分のための最適条件を決定した。本条件により、11種標準品混合標準液を用いて、検量線を作成したが、いずれの成分についても相関係数0.999の良好な直線性が得られた。また、市販の製剤の成分において、本法により定量しその回収率を算出したが、いずれの成分においてもほぼ100%の良好な回収率が得られた。さらに、本法は市販のドリ-ンク剤や錠剤及び顆粒剤の成分に適用した結果、これらの成分が比較的短時間に再現性よく分別定量することができ、かつ実用し得ること確かであった。



1: コンドロイチン硫酸 2: クエン酸 3: リンゴ酸 4: D-グルクロン酸 5: P-アミノサリチル酸 6: DL-アスパラギン酸
7: コハク酸 8: 安息香酸 9: アスコルビン酸 10: L-グルタミン酸 11: パントテン酸

11 共沈濃縮-細管式等速電気泳動法による海水中のフッ化物イオンの定量

(神船大・阪工試) ○ 富士恵一・日色和夫

1 目的 海水中のフッ化物イオンは吸光光度法, イオン電極法およびイオンクロマトグラフ法等により分析されているが, いずれの方法においても妨害イオンの存在等が問題となっている。著者は前回, 海水中の各種リン酸イオンを水酸化マグネシウム共沈法で濃縮後, 細管式等速電気泳動法で分析する方法を確立した。この際, 同時にフッ化物イオンも共沈されることを見いだした。今回この方法を海水中のフッ化物イオンの定量に応用し, 分析条件を確立するために研究を行った。

2 実験 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置 IP-2A型を使用し, 泳動管は内径1.0mm, 長さ80mmのPTFE製チューブに, 内径0.5mm, 長さ200mmのFEP製チューブを接続したものである。検出器は電位分配検出器を用い, 泳動電流は250~300 μ Aで通電した後, 75 μ Aに切り換えて泳動させた。水素イオン形陽イオン交換樹脂は, Dowex 50^WX8 (100~200メッシュ)を常法に従ってコンディショニングしたものを用いた。

3 結果 先行液として0.006M硝酸カドミウム, 後続液として0.01Mクエン酸, 先行液として0.01Mヒスチジン1塩酸塩-0.1%トリトンX-100, 後続液として0.01Mヘキサンの2種類の電解液の系について検討した。前者の電解液系を用いた場合には, 硫酸イオンがフッ化物イオンと混合ゾーンを形成し, フッ化物イオンの定量を妨害したが, 後者の電解液系では妨害が認められなかった。そこで後者の電解液系を用い, フッ化物イオンの検量線を作成したところ, 直線性の良い検量線が得られた。次にフッ化物イオン共沈時の水酸化ナトリウム溶液の添加量, 沈殿洗浄用水酸化ナトリウム溶液の濃度について検討した。その結果試料50mlに対し, 前者は1N水酸化ナトリウム1.5ml, 後者は10⁻³Nが最適であった。フッ化物イオンを添加した人工海水試料を用いて, 生成した沈殿を水素イオン形陽イオン交換樹脂で溶かし, 濾過した液50 μ lを装置に導入して検量線を作成したところ, 直線性の良い検量線が得られ, フッ化物イオンの回収率は約70%であった。検量線法と標準添加法により, 海水中のフッ化物イオンを分析した結果をTable 1に示す。

Table 1 Results of determination of fluoride ion in sea water samples

Sample No.	Sampling site	Sea water samples			F found(mg/l)	
		Temperature(°C)	pH	Concentration of salt(%)	Working curve method	Standard addition method
1	Inside of the pond of KUMM	9.5	8.24	3.4	0.87	1.0
2	Outside of the pond of KUMM	9.3	8.29	3.3	1.2	1.3
3	Uozakihama-machi	9.3	8.49	3.2	1.3	1.3
4	Sumiyoshihama-machi	9.7	8.52	3.1	1.2	1.3
5	No.4 Maya pier	9.8	8.58	3.2	1.2	1.1
6	Port of Kobe	9.4	8.58	3.3	1.3	1.3
7	Nagata harbor	9.7	8.44	3.4	1.2	1.2
8	Suma beach	8.8	8.54	3.5	1.2	1.2
9	Fukaehama-machi	10.6	8.53	3.2	1.2	1.1
10	Nishinomiya harbor	11.4	8.48	3.2	1.2	1.4
11	Koshien ferry terminal	9.4	8.49	3.4	1.2	1.1
12	Port of Amagasaki	12.8	8.59	1.8	0.97	0.97

Sampling date: April 4, 1984
KUMM: Kobe University of Mercantile Marine

12 紙の褐色斑の有機酸について

東京国立文化財研究所 ○新井英夫・香椎 健・会田孝士

絵画・書籍等紙質類文化財の劣化に、褐色斑臭 (foxing) の発生する現象がある。欧米では、foxing に対する関心が高く、大正8年(1919)から foxing の記載が認められ、最近でも原因究明の研究が行われている。たとえば、foxing の形成要因として鉄化合物主因説があるが、foxing 部位の鉄分析を実施して鉄化合物の蓄積が認められない、foxing の原因は生物と無関係、foxing は塩素系漂白剤を使用するようになった1780年以後に発生、foxing を蛍光顕微鏡で観察すると糸状菌の菌糸が認められる等々の報告があるが、未だ定説がない。

筆者らは、昭和49年以來、foxing の原因を究明したいと考え、機会あるごとに foxing の発生した試料を収集し、実験を重ねてきた。近年、foxing 試料をある水分環境に保つと foxing 部位に特異的に糸状菌の発生することが判明した。筆者らは、これを foxing 形成要因および形成機構を究明する糸口とし、foxing の防除対策の確立に資することを目的とし foxing の保存科学的研究を推進している。

1. Foxing の試料

宇治の平等院鳳凰堂の建築彩色が、小場恒吉画伯等によって、昭和30~35年にかけて雲肌厚口麻紙に復元模写された。この建築彩色復元模写画は、額装にして昭和47年から同院宝物館に收藏・展示された。昭和52年頃から模写画々面上に foxing が目立つようになり、昭和57年に foxing の修復が行われた。その雲肌厚口麻紙(以後麻紙と略記する)の一部を foxing の試料として受領した。その他版画、洋紙本等を試料として収集している。

2. Foxing の観察

Foxing の発生した麻紙について、foxing を形成していない白色部位と foxing を形成している褐色部位を、走査型電子顕微鏡(以後 SEM と略記する)で観察した。その結果、foxing を形成していない部位の SEM 像は、麻紙の繊維のみが交錯しているが、foxing 形成部位の SEM 像は、麻紙の繊維上に無数の付着物が認められ、これは糸状菌の菌糸と分生子が散在しているものと考えられた。

3. Foxing から糸状菌の分離

Foxing の発生した紙から糸状菌を分離するとき、従来は foxing 部位を無菌的に平板培地に接種して分離しようとしてきた。しかし、この方法では紙に付着している生育可能なすべての糸状菌が分離されるので、foxing 形成部位の糸状菌を分離しているかどうか判別ができなかった。筆者らは、水分活性(Aw)を0.94, 0.84, 0.75に調整したデシケータの一種内は、foxing の発生した紙片を保って分離した。すなわち、Aw=0.94 で25℃に保つと4~7日後に、Aw=0.84 で25℃に保つと25~30日後に foxing 上にはのみ糸状菌の分生子頭が特異的に発生した。これを SEM で観察すると、糸状菌の分生子が麻紙の繊維上に著しく増殖しているのが明らかとなった。各種の紙の foxing から25株の糸状菌を分離して純粋培養株とし、以後の実験に供試した。

4. Foxingの有機酸分析

筆者らは、foxingの形成に糸状菌の代謝生成する有機酸が関与していると考え、foxingに関連する有機酸分析を、細管式等速電気泳動装置で実施している。今回は、foxing部位からの直接抽出液とfoxingから分離した糸状菌の代謝生成する有機酸の分析を実施した。その結果を報告する。

4.1 方法: (1) 直接抽出法

麻紙等は形成されたfoxing部位から直接抽出を行なった。各30片のfoxing部位紙片を蒸留水に浸し、5.0、10、15、20%のPVP-20水0.4mlに浸漬し、25°C、40時間保つて抽出した。不純物を除去した抽出液は、凍結乾燥で濃縮し、PVP-20を排除した。これは150μlの蒸留水を加えて再溶解し、有機酸分析用試料とした。

(2) Foxing要因糸状菌の生成する有機酸

筆者らは、糸状菌の生成する有機酸をこれまで液体培地で実施してきたが、好溶性糸状菌の液体培養が困難であること、培地組成が有機酸に影響を及ぼす、液体培地がマイクロ細管部にトラップを生ずる等の問題を遭遇した。そこで、培地組成に影響されない培養方法を考え、新たにfoxingから分離した好溶性糸状菌の生成する有機酸を分析した。

接種した後、 $Aw=0.94$ に調整した減菌コシウエーエント中に入れ、25°Cで2週間培養した。糸状菌の繁殖させたコシウエーエントは、そのまゝ小試験管に移し、一定量の蒸留水を加え、15°Cで24時間保つて有機酸を抽出した。その上澄液を分析用試料とした。

4.2 結果: (1) 直接抽出法

蒸留水の抽出液中には、7.7μmol/lのシタロン酸、3.31×10⁻⁴mol/mlのシリンゴ酸、4.96×10⁻⁴mol/mlが抽出された。その他に微量のシタロン酸、2.7×10⁻⁵mol/mlが抽出された。

各濃度のPVP-20水の抽出効果を比較すると、15% PVP-20水の抽出効果は、10% PVP-20水に安定していた。10% PVP-20水の抽出効果がこれに次ぎ、5%と20% PVP-20水では7.7μmol/lの抽出量が減少した。この結果から、次のPVP-20水による抽出は、15% PVP-20水を用いることにした。PVP-20水の抽出液では、蒸留水抽出で抽出できなかった酢酸が抽出できると、1.1μmol/lの抽出量が蒸留水の2倍に向上した。しかし、7.7μmol/lの抽出量は、10%同等であった。

(2) Foxing要因糸状菌の生成する有機酸

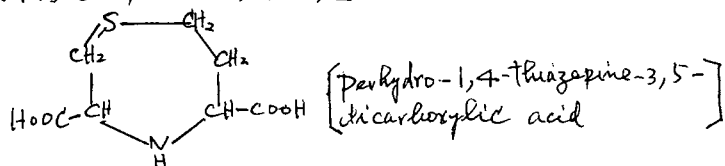
供試したAspergillus sp. 8株とPenicillium sp. 2株は、10μlの水を7.7μmol/lの酢酸または1.1μmol/lの酢酸を生成し、酢酸を同時に生成してAspergillus sp. 6株/株抽出された。

以上の結果から、foxing部位からの直接抽出液に抽出された有機酸とfoxing部位に特有的に生育する絶対好溶性糸状菌の生成する有機酸との間に関連性が認められた。

見 玉 裕 敬 (高知医科大学・化学教室)

細管式等速電気泳動法は電荷をもつ物質を分析の対象として、無機イオン、有機酸、アミノ酸及びωペプチドなどの低分子量の物質の定量分析に応用されてきた。しかし、近年になって蛋白質等の高分子化合物のそれへの応用が試みられてゐる。

我々はこれまでに、本法を利用して生体成分で、タウリン、Glutathione、γ-Amino-butyrlic acid、Cystathionine等の定量、及びメチルマロニ酸血症のよう、その尿中のメチルマロニ酸を排泄している患者、isovaleric acidemiaへ及ぶその尿中の Isovalerylglycineを大量に排泄している患者のスクリーニング、又 Cystathioninuriaの患者のよう、その尿中の Cystathionineと同一、Parahydro-1,4-Thiazepine-3,5-dicarboxylic acidと云う7員環の物質が排泄されること加知られてゐた。しかしこの物質は始めにニヒドリンと反応せず、この物質のよい定量方法が見出されてゐなかった。そこで我々は本法を利用して、この物質の定量方法を確立した。



更に、最近 iminopeptiduria へ及ぶ prolidase の欠損している患者に、その尿中の大量の iminopeptides (Gly-pro 等) を排泄している患者及びその母親の赤血球中の Prolidase 及び Prolinase 活性の測定に本法を応用したことで、これらの物質の定量方法及び同酵素活性の測定方法等について述べた。

文献

- 1) Kodama, H. and Yuasa, S. J. Chromatogr., 163, 300-303 (1979)
- 2) Mikasa, H., Sasaki, K. and Kodama, H. J. Chromatogr., 190, 501-503 (1980)
- 3) Kodama, H., Yamamoto, M. and Sasaki, K. J. Chromatogr., 183, 226-228 (1980)
- 4) Mikasa, H., Ageta, T., Mizoguchi, N., and Kodama, H. J. Chromatogr., 202, 504-506 (1980).
- 5) Ageta, T., Mikasa, H., Kojima, K. and Kodama, H. J. Chromatogr., 233, 361-364 (1982)
- 6) Mikasa, H., Ageta, T., Mizoguchi, N., and Kodama, H. Anal. Biochem. 126, 52-57 (1982).
- 7) Kodama, H., Mizoguchi, N., Sasaki, K., and Mikasa, H. Anal. Biochem. 133, 100-103 (1983).
- 8) Mikasa, H., Sasaki, K., and Kodama, H. J. Chromatogr., 305, 204-209 (1984).

Isotachophoresis による赤血球内 2,3 の物質の測定 とその臨床応用について

国立療養所南岡山病院

○木畑正義 出宮通孝 三島康男 渡辺佳子

赤血球は 120 日の寿命をもつて血液中に存在する。赤血球膜成分及び血色素は幼若期から成熟し老化する過程に於いて変化をうけ、又生体の環境の種々な変化に影響される。一方成分が変化を受けると赤血球の機能、即ち酸素の運搬、解離に差異が生じ、又赤血球変形能にも変動が生ずると言われる。著者は以前より血清脂質と赤血球内脂質、特にビタミン E について検討し血清脂質のうちでも HDL 中のビタミン E と赤血球内ビタミン E 量とが関連があること、又加齢や糖尿病では赤血球内のビタミン E の減少することを認めた。又赤血球を超速沈分離し幼若赤血球と老化赤血球でもこれらの量に差があることを示した。

今回は Isotachophoresis により赤血球内の解糖系物質の 2,3 のものが同時に測定し得る点に注目しその臨床応用について検討した。今回測定し得た物質は、2,3 DPG, ATP, P_i , Lactate, Succinate であるが、尚 2,3 の物質が明らかに chart 上に認められた。測定し得た物質について、三群の対象より得た成績を報告する。

(方法) 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置 (IP-2A) を用いた。泳動にはリーティンク液に HCl, β -Alanin, HEC, ϵ -Amino Caproic acid, (PH 4.3), ターミナル液に 0.01 M *m*-Caproic acid, 分離管内径 1.0mm \times 長さ 40mm + 内径 0.5mm \times 長さ 100mm とし、電流は, Ist stage 200 μ A 10分, IInd stage 100 μ A, (20 $^{\circ}$ C) とした。chart speed 40mm/min に 2 potential 微分変換及び UV 吸光を記録した。

(材料) 被験者静脈より採血し、赤血球数、ヘマトクリット (Ht), ヘモグロビン (Hb) 等を測定後赤血球を分離し saline-phosphate buffer にて 3 回洗浄する。次いで Ht が各々 50% になる程度に蒸留水を加え溶血せしめ、この段階で再度 Hb を測定する。溶血後は、micro wave oven (500w) にて瞬間加熱し除蛋白を行った。本操作は検体に変色し凝集するのを見届けて終了するが、3~7 秒を要した。更に 15,000 回転に遠沈し淡黄色の上清を資料とし、その 10 μ l を装置に注入した。

(成績)

(1) Standard として市販の 2,3 DPG, ATP, P_i , Lactate, Succinate, の単品或いは混合液を注入しそれぞれ 0.11, 0.22, 0.29, 0.37, 0.46, の PU 値を得た。又混合液の分離も良好であることを確認した。(図-1) Standard curve はそれぞれ 2~15 μ g (P_i は 0.02~0.15) について検討し直線性を示した。

(2) 資料は図-2 に示す様な曲線を得るが少くとも 10 種類の物質が認められた。そのうち現在 2,3 DPG, ATP, P_i , Lactate, ADP, Succinate, が確かめられるが、今回の検索の対象として 2,3 DPG, ATP, Lactate, を選んだ。尚資料に一定量の standard 物質を添加して泳動すると各曲線部分は添加分だけ延長したことから資料の各部分は standard 物質と同一のもの確認した。

(3) 2,3 DPG, については資料に PGM (phosphoglycerate mutase) 及び glycolate-2-phosphate を添加し分離することにより、2,3 DPG の曲線が全く消失することを認めた。(図-3)

(4) 臨床例についての結果、対象は ①-A: 20 才より 50 才までの健常男子 27 名, ①-B: 同、女子 15 名, ②-A: 65 才以上で高血圧、動脈硬化症、胸痛症などはあるも急性疾患のない男子 14 名, ②-B: 同、女子 20 名, ③: 糖尿病等のコントロール不良のもの, ④: 着

護学生 100名である。これらの成績を一括して表に示す。(表-1) 2,3 DPG は①-A、①-B に対し、②-A、②-B 及び③では有意に高く ($P < 0.01 \sim 0.001$), ④ではむしろ低い。ATP は④が①に比し低い。又 Lactate は①-A、①-B に対し他群では何れも高い値を示した。

(考按) Isotachopheresis の臨床応用についての成績は殆んどみられない。赤血球内物質をこの方法で測定することの有用性については尚検討の余地が少なくないが、今回の検討はいくつかのものを同時に測定し得る可能性が示されたと考えられる。得られた結果の意義について赤血球機能、生体の状態を加味して考察することが必要であり今後その角度からの検討を行いたい。

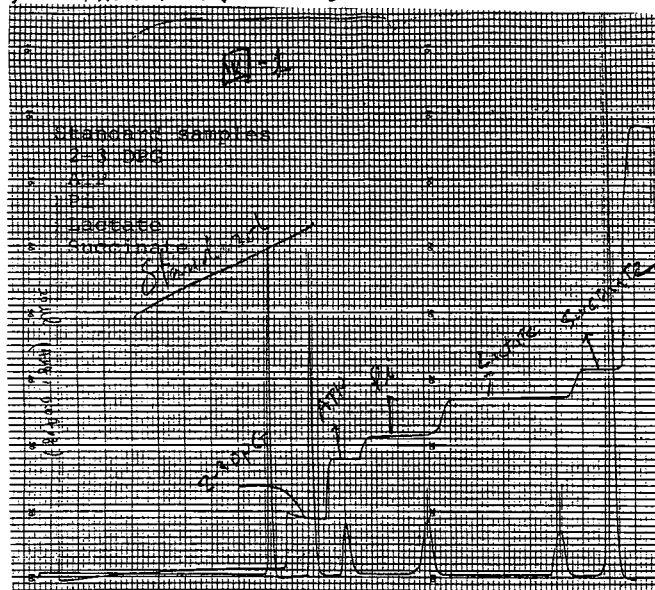
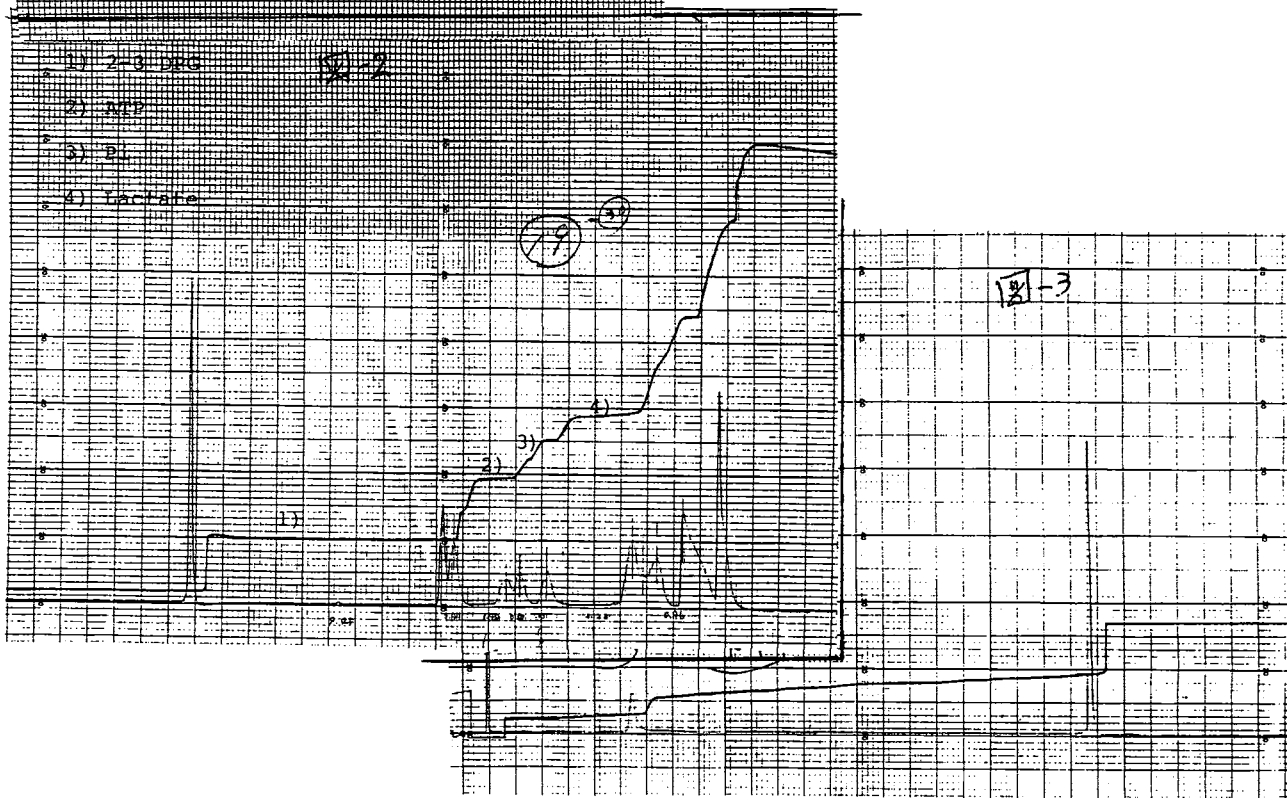


表-1

CONCENTRATION OF SOME SUBSTANCES IN RED CELL (by Isotachopheresis)							
SUBSTANCE	GROUP	AGE	SEX	n	MEAN ± SD		
2-3 DPG mg/Hg	(1)-A	20-50	male	27	12.10	1.30	
	(1)-B	20-50	female	15	12.99	1.28	
	(2)-A	65-85	male	14	15.24	2.56	
	(2)-B	65-85	female	20	13.52	1.79	
	(3)	40-76	both	8	15.53	3.90	
	(4)	18-21	female	100	10.30	1.85	
	ATP mg/Hg	(1)-A				3.21	0.46
		(1)-B				3.70	0.64
(2)-A					3.43	0.68	
(2)-B					3.53	0.89	
(3)					3.91	0.94	
(4)					2.36	0.55	
Lactate mg/Hg		(1)-A				1.15	0.17
		(1)-B				1.15	0.16
	(2)-A				1.73	0.32	
	(2)-B				1.57	0.36	
	(3)				1.68	0.68	
	(4)				1.85	0.56	



14 細管式等速電気泳動法による精液中のコリンの定量

高知医科大学 法医学教室・化学教室*

○津々見明, 揚田富子*, 沖義一, 児玉裕敬*, 石津日出雄

ヒト精液中には非蛋白質成分として前立腺由来のポリアミン及び精嚢腺由来のコリンが多量に存在することが知られている。法医学の領域ではこれらの成分を精子の検出が困難な場合における精液の化学的証明に利用している。昨年の本シンポジウムにおいて, 私どもは細管式電気泳動法(イソタコ法)を用いてヒト精液中のスベルミンを検出することにより, 精液の証明が可能であることを証明した¹⁾。今回はスベルミンと同様に精液中に多量に含まれるコリンをイソタコ法により検出する方法について検討し, 微量の精液からコリンを定量的に検出する条件を確立したので報告する。

材料及び方法

当大学中央検査部および松山赤十字病院より得たヒト精液 $50\mu\text{l}$ に3倍容の2% TCA 溶液を加え遠心分離して除蛋白し, その上清を Diaion SK-1 (H^+ -form) のカラムにかけ, 蒸留水, 0.2 N-HCl 40 ml 及び 2 N-HCl 10 ml で洗った後 2 N-HCl 20 ml で溶出した。その溶出液を減圧乾固し, 残渣を蒸留水 0.2 ml に溶解し, その $2\mu\text{l}$ を等速電気泳動装置に注入した。分析装置は, 島津細管式等速電気泳動装置 IP-1B 型を使用した。電解液は, 先行液に 0.01 M potassium acetate + AcOH (pH 4.0), 終末液に 0.01 M D-L-carnitine chloride を使用した。泳動電流は $75\mu\text{A}$ とした。

結果及び考察

精液からは, 標準品のコリンと同じ potential gradient のゾーンが検出された。また, 精液抽出物に標準品を加えて泳動すると完全に単一のゾーンが得られた (Fig.1)。

次にコリンを定量する為に検量線の作成及びコリンの回収テストを行なった (Fig.2)。コリンの検量線は, 0-50 μmol の範囲で原点を通る良い直線性を示した。次に同一精液につきコリンオキシダーゼ, ペルオキシダーゼを用いる吸光光度法²⁾ とイソタコ法によるコリン検出量を比較したが両者の値はよく一致した。このことはイソタコ法が生体物質のコリンの定量に十分利用できることを示している。定性の指標であるコリンの PU 値は 0.36 であった。またイソタコ法による精液中のコリンの検出限界は新鮮精液で $10\mu\text{l}$ であった。

同法によりヒト精液および各種体液中のコリン含有量を測定した結果, 正常精子群では平均 $1.863 \pm 0.249\text{ mg/ml}$, 乏精子群では平均 $1.853 \pm 0.335\text{ mg/ml}$, 無精子群では平均 $1.738 \pm 0.320\text{ mg/ml}$ であり, これら3群の間に有意の差は認められなかった ($P < 0.05$)。また精液以外の唾液, 唾液, 血液, 尿および母乳からはコリンは検出されなかった。

以上のことより私どもが確立した細管式等速電気泳動法によるコリンの検出法は法医学的精液証明法として利用できる可能性がある。

参考文献

- 1) 津々見明, 児玉裕敬, 石津日出雄: 細管式等速電気泳動法による精液からのスベルミンの検出。医学のあゆみ, 129 (1), 15-16, 1984.
- 2) Tsutsumi, A. et al.: A method for the identification of seminal stains by enzymatic assay of choline. Jpn J Legal Med (accepted).

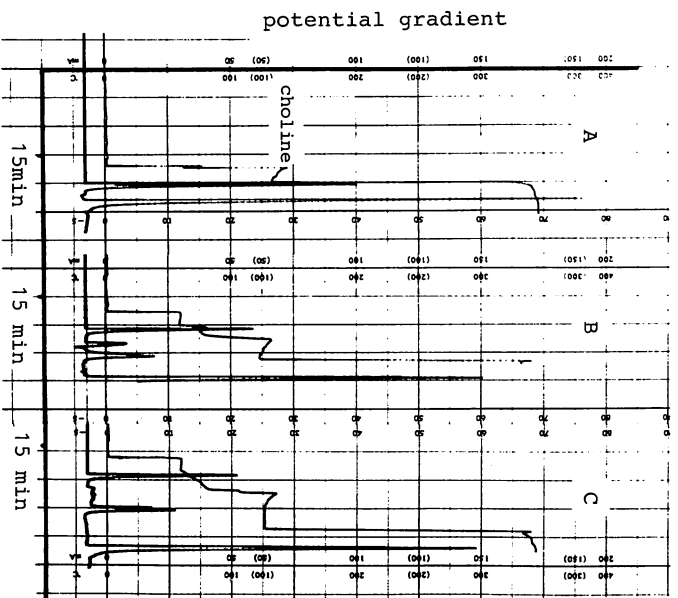


Fig.1 Isoachrophoretic runs of authentic choline (A), seminal sample (B) and mixture of authentic choline and seminal sample (C). The leading electrolyte was 0.01M potassium acetate + AcOH (pH4.0). The terminating electrolyte was 0.01M D-L-carnitine chloride. The migration current was 75 μ A. The chart speed was 10mm/min.

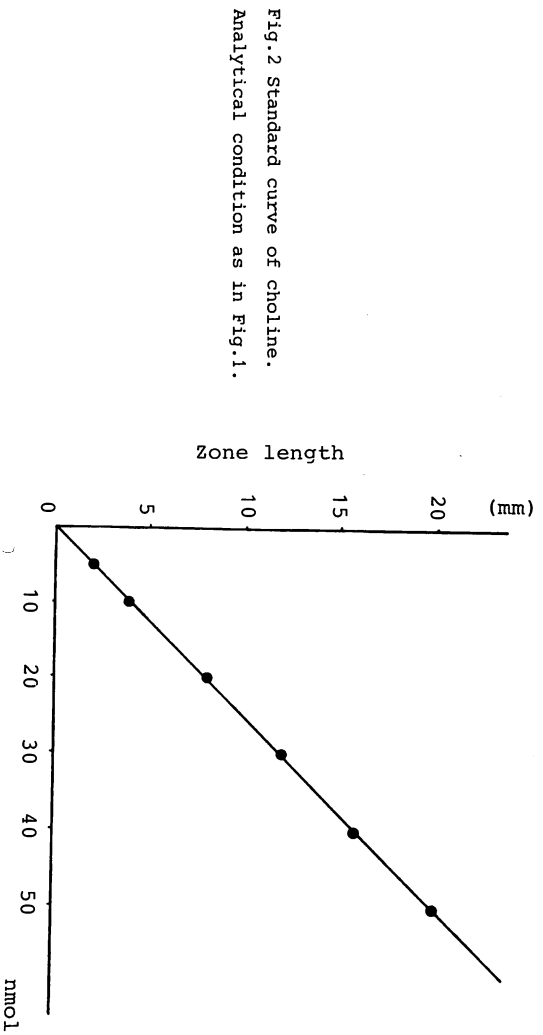


Fig.2 Standard curve of choline.
Analytical condition as in Fig.1.

15 微量顎関節液の糖蛋白に関する研究 -特にヒアルロン酸, コンドロイテン硫酸の定性, 定量法について-
大阪歯科大学口腔外科学教室第一講座 大阪歯科大学化学教室*
○森本伊智郎, 久保諒修, 植野 茂, 覚直健治, 白教力也,
二川修治*, 外海啓一*

目的 顎関節疾患において, 顎関節液の性状を知ることはその病態を把握するうえで重要な意味を持つと考えられる。一般に正常関節液の主成分は酸性ムコ多糖であるヒアルロン酸であり, 病的関節ではコンドロイテン硫酸が関節液中に出現してくる。従来よりヒアルロン酸やコンドロイテン硫酸などの酸性ムコ多糖の測定には様々な方法が用いられてきたが, 試料の前処理が煩雑であったり, 分離時間が長かったり, また微量試料では分析が困難であるなどの理由から, 顎関節液の分析には応用されていなかった。今回, 私たちは等速電気泳動法を用いて無処理の微量試料からヒアルロン酸, およびコンドロイテン硫酸の検出系について検討を行った。

方法 試料の分離には島津製細管式等速電気泳動装置 (IP-1B型) を用い, 電位勾配検出器 (PGD-1型) によって検出した。標準試料はヒアルロン酸 (シグマ), コンドロイテン4-硫酸 (半井化学), デルマトン硫酸 (生化学工業), コンドロイテン6-硫酸 (生化学工業) の0.1%水溶液を作製し, その1~10 μ lを用いた。泳動管条件は1.0mm ϕ \times 10cm + 0.5mm ϕ \times 20cm, 恒温槽温度は室温とした。先行電解液は塩酸, ヒステジン, ヒステジン塩酸塩, β -アラニン, アメジオール, アセトン, メタノールを用い, 終末電解液は n -カプロン酸, MESを用いた。これらの条件から泳動電流, 電解液などの至適測定条件について検討した。さらに, 歯牙年齢 M_2/M_2 齢の雄性 *Macaca Fascicularis* の顎関節液を採取し, 純水で10倍希釈した後, その5 μ lを試料として, 至適測定条件にて測定した。

結果 泳動電流: 250 μ A \rightarrow 150 μ A \rightarrow 25 μ A, 先行電解液: 0.02M ヒステジン塩酸塩 + ヒステジン (pH4.2) + アセトン30%, 終末電解液: 0.01M n -カプロン酸と泳動電流: 200 μ A \rightarrow 100 μ A \rightarrow 50 μ A, 先行電解液: 0.01N塩酸 + β -アラニン (pH2.8) + メタノール40%, 終末電解液: 0.01M n -カプロン酸の2種類の条件でヒアルロン酸, コンドロイテン硫酸の分離ができた。しかし, コンドロイテン4-硫酸, デルマトン硫酸, コンドロイテン6-硫酸を同時に分離する条件は, 見い出すことができなかった。また, 歯牙年齢 M_2/M_2 齢の雄性 *Macaca Fascicularis* から採取した微量顎関節液を試料として, 至適測定条件にて測定したところ, 4mg/ml濃度のヒアルロン酸が検出できた。

高知医科大学 化学教室 児玉 裕敬 ○三笠 洋明
高知医科大学 皮膚科学教室 荒田 次郎 大野 貴司

Prolidase は, X-pro あるいは X-Hyp のような iminodipeptides を X + Pro 又は X + Hyp に加水分解する酵素であり, ProlinaseはPro-Xのような iminodipeptidesの加水分解反応を触媒する酵素である。

Prolidase 活性の基質としては Gly-Pro を, Prolinase活性の基質としては Pro-Gly を用いた。これまで, 上記の酵素活性を測定する方法としては, (1)ペプチド結合に由来する 220 nm の吸光度の減少の測定, (2) Chinardの方法による遊離プロリンの定量, (3)加水分解により新たに生じたカルボキシル基の滴定による定量, の3つの方法が用いられてきた。勿論, 上記の方法は, 両酵素活性を単独で定量する事はできるが, 同時定量する事はできない。

今回, 我々は細管式等速電気泳動法を用いて赤血球中の Prolidaseと Prolinase活性の同時定量を試みた。

〔方法〕

Prolidase deficiency の患者, 及びその母親の血液 10 ml をheparinigeし, これに生理的食塩水で調製した 6% dextran (分子量 200,000 - 300,000 和光純薬) 溶液を同容加え, 攪拌後 60分間放置する。白血球に富んだ上層を除き, 下層の赤血球を同容の生理的食塩水で 3 回洗う。

次に, 凍結融解を 2 回行い, 細胞膜を破壊する。この lysate を 50mM Tris - HCl buffer pH=7.40 に対して over night 透析を行なう。この透析内液を酵素原液として使用した。保存は - 80°Cで行なつた。

(1) 酵素溶液: 50mM Tris - HCl buffer pH = 7.40 に 1mM MnCl₂ を含む medium で赤血球の lysate を薄め, 蛋白量を約 10 mg/ml としたものを 37°C で 60分間 preincubate した。

(2) 基質溶液: 酵素溶液と同じ medium で Gly-Pro は 10mM, Pro-Gly は 20mM の濃度に調製した。

(3) 反応: 酵素溶液 1.5ml と基質溶液 1.5ml を混合し, 37°C で incubate した。一定時間毎に 0.2ml の反応液を採取し, 100°C で 3分間加熱して反応を止めた。

(4) 酵素活性の測定: 反応液を遠心分離し, 5μl の上清を細管式等速電気泳動分析装置に導入して分析を行なつた。装置は IP - 1B (島津製作所) を用い, 検出器は PGD - 1を用いた。Leading electrolyte は 10mM HCl + amediol pH = 6.00 (0.05% PVA), Terminal electrolyte は 10mM GABA + Ba(OH)₂ pH = 10.90, を用いた。泳動電流 75 μA, 検出器の温度は 20°C, チャートスピードは 20mm/min とした。

蛋白定量は Lowry 法によつた。

〔結果, 及び考察〕

上記の分析条件で Gly-Pro, Pro-Gly 及び Gly が分離できた。その Isotachopherogram を Fig.1に示す。Prolinaseのみの測定結果を Table 1に示す。細管式等速電気泳動法によると, Glyの生成量と, Pro-Gly の減少量は良い一致を示している。又その値が, 十分信頼に足

るものである事は、Chinardの方法による測定値との比較から明らかである。

Prolidase と Prolinase 活性の同時定量は、各々の基質である Gly-Pro と Pro-Gly の減少量を測定する事により行なつた。prolidase deficiency の患者及びその母親の赤血球中の両酵素活性の時間的変化を Fig.2 に示す。母親の赤血球の場合、Gly-Pro は60分のincubate間に 6% が加水分解されるが、患者の赤血球の場合 Gly-Pro は殆んど減少しない。Pro-Gly の減少は、患者とその母親の間に差は見られず、共に約 6% 程分解された。この Gly-Pro と Pro-Gly の減少量の和は、Gly の生成量に等しい筈である。それを示したのが Table 2 であり、両者は良く一致している。

本法で決定した Prolidase と Prolinase 活性値 (specific activity) を Table 3 に示す。

以上の結果は、この方法が、両酵素活性の同時定量のみならず、Prolidase 欠損症のスクリーニングへの応用も可能である事を示している。

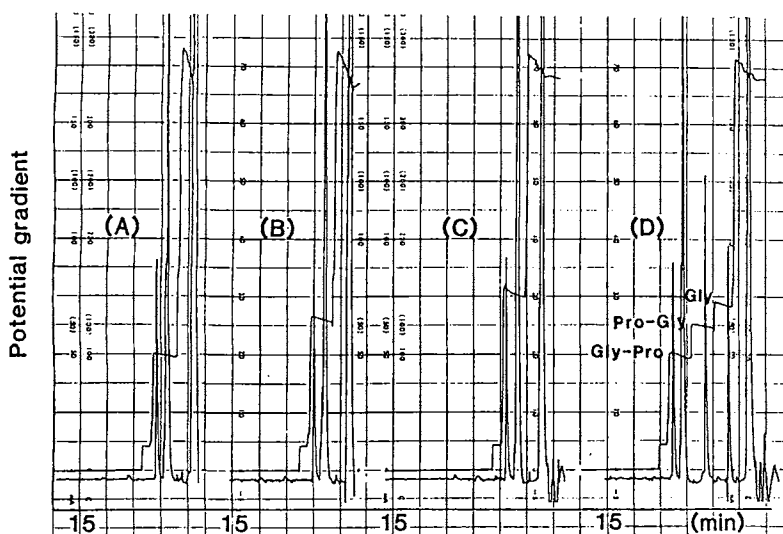


Fig. 1 Isotachopheric runs of authentic Gly-pro(A), Pro-gly(B), Gly(C) and the mixture of Gly-pro, Pro-gly, Gly(D). Analytical conditions as follows; The leading electrolyte was 0.01M hydrochloric acid and 2-amino-2-methyl-1-propanol (containing 0.05 % polyvinyl-alcohol pH 6.00). The terminal electrolyte was 10 mM GABA and Ba(OH)₂ (pH 10.90). The chart speed was 10 mm/min and migration current was 75 uA

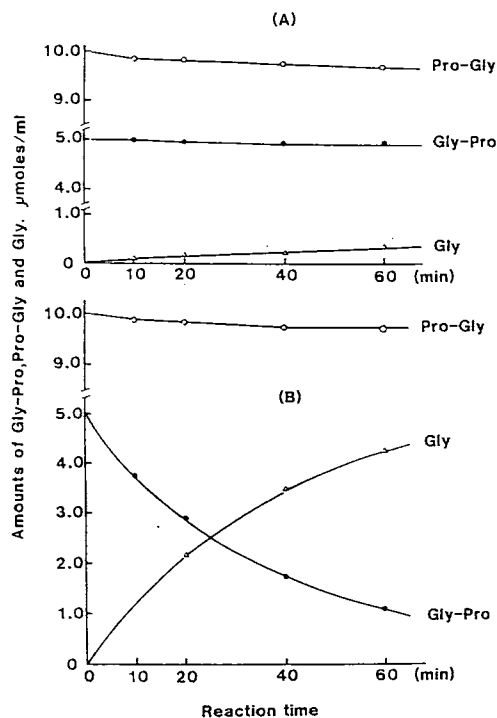


Fig. 2 The relation of incubation time of prolidase and prolinase activities in erythrocytes from a patient with iminopeptiduria (A) and her mother (B). Analytical conditions are the same as in Fig.1.

Comparison of Prolinase activity in red blood cells of a patient with iminopeptiduria and her mother determined by Chinard's method and an isotachophoretic analyzer.

Incubation time (min)	Chinard's method		Isotachophoresis			
	Proline values		Glycine values		Pro-Gly values	
	patient	mother	patient	mother	patient	mother
0	0.00	0.00	0.00	0.00	5.00	5.00
5	0.19±0.04	0.17±0.02	0.20±0.03	0.14±0.06	4.80±0.04	4.85±0.03
10	0.40±0.03	0.29±0.03	0.35±0.05	0.24±0.04	4.66±0.05	4.75±0.08
20	0.59±0.03	0.40±0.08	0.55±0.04	0.32±0.07	4.48±0.04	4.65±0.09
30	0.69±0.04	0.45±0.06	0.66±0.07	0.35±0.08	4.38±0.04	4.62±0.04

Values of proline, glycine and Pro-Gly represent mean ± SD (μ moles/ml) obtained in each experiment (n=3).

Simultaneous measurement of Prolidase and Prolinase activities in red blood cells from a patient with iminopeptiduria and her mother determined by an isotachophoretic analyzer.

incubation time (min)	Gly-Pro values		Pro-Gly values		Gly values	
	patient	mother	patient	mother	patient	mother
0	5.00	5.00	10.00	10.00	0.00	0.00
10	4.95	3.76	9.84	9.84	0.15	1.31
20	4.93	2.90	9.79	9.81	0.20	2.24
40	4.90	1.75	9.74	9.76	0.25	3.51
60	4.90	1.15	9.68	9.70	0.35	4.25

values of Gly-Pro, Pro-Gly and Gly represent mean (μ moles/ml) obtained in each experiment (n=4)

Specific activities of prolidase and prolinase in red blood cells from a patient with iminopeptiduria, her sister, and mother determined by an isotachophoretic analyzer.

	prolidase	prolinase
patient	1.9 ± 0.14	10.0 ± 1.02
sister	1.5 ± 0.19	8.8 ± 0.93
mother	56.0 ± 0.93	6.2 ± 0.24

values represent mean ± SD (10^{-4} μ moles/min-mg protein) obtained in each experiments (n=4).

分析を行うと β -Ala. の電位勾配値まで検出でき、 β -Ala. をターミナルイオンとしたのと同様になり、 H^+ よりも電位勾配値が大きく、 β -Ala. よりもその値が小さい化合物を検出でき、しかも、通電性は良い。 H^+ をターミナルイオンとした場合の各イオンの導入量とゾーン長の関係を調べたところ、両者に比例関係が得られ、定量性が確認できた。

血清タンパクの分析には、血清量 $1 \mu l$ 、スパーサーイオン溶液〔1%アンフォライン pH 5~8 水溶液 + Arg., His., EACA, GABA, β -Ala. の各 $1 mg / ml = (5 + 1) \times 5 \mu l$ を分析装置に連続して導入するのが適している。リーディング電解液は pH 6.2 を採用した。

リーディング電解液への HPMC の添加によるタンパク質の分離状態はイソタコフェログラム上無添加の場合とほとんど変化が無く、無添加でも十分な分離が得られる。これは pH が 7 以下にあり、電気浸透の影響が少ないためと考えられる。また、HPMC とタンパク質の相互作用も見られない。

UV D 信号として得られた化合物がタンパク質か否かを調べるために、マイクロウェーブ法³⁾により除タンパクを行い、その上清を分析に供したところ、UV 吸収物質は全て消失した。

図. 2 にリーディング液の pH 6.2 における血清タンパクの分析例を健常人、骨髄腫患者について示す。この分析条件ではアルブミンは検出されない。IgA 型骨髄腫患者血清タンパクのイソタコフェログラムから、IgA の位置が明らかになり、PI 4.8~5.6 の近傍のタンパク質を示すものと考えられる。IgG 型骨髄腫患者血清のイソタコフェログラムから、IgG の位置が推定できる。この IgG はセルロースアセテート膜電気泳動法でスロー γ 位にピークがみられる。

その他、リゾチーム、チトクローム C、ヘモグロビン、インシュリンなどについて、陽イオン分析を行った。

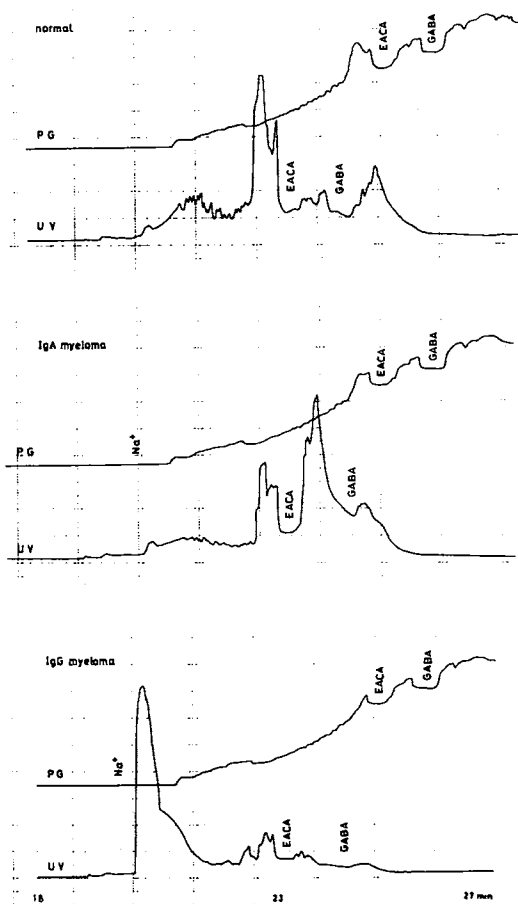


図. 2 血清タンパクの陽イオン分析

参考文献

- 1) 第3回イソタコシンポジウム講演要旨集 (1983)
- 2) P. Delmotte, Sci. Tools 24, 3, 33 (1977)
- 3) T. Yamada, et al.; Acta. Med. Okayama 36, 5, 399 (1982)

表1

Anion	charge (Z) at pH 9.0	molecular weight	MW ^{1/3}	Z/MW ^{1/3}
calmodulin	-24.36	17000	25.71	-0.947
albumin	-22.0	68000	40.82	-0.541
transferrin	-22.30	90000	44.81	-0.498
IgG (pI 6.0)	-16.64	150000	53.13	-0.313
IgG (pI 7.0)	- 7.64	150000	53.13	-0.144
IgG (pI 9.2)	+ 2.36	150000	53.13	+0.044
Cl	- 1.00	35.5	3.29	-0.304
thiobarbituric acid	- 1.00	200.3	5.85	-0.171
barbital	- 0.98	128.1	5.04	-0.194
hypoxanthine	- 0.67	136.1	5.14	-0.130
tryptophan	- 0.29	204.2	5.88	-0.049
uracil	- 0.24	112.1	4.82	-0.050
phenol	- 0.09	94.1	4.55	-0.020
aminocaproic acid	- 0.02	131.1	5.08	-0.004
glycine	- 0.20	75.1	4.22	-0.047
alanine	- 0.17	89.1	4.47	-0.038
valine	- 0.19	117.2	4.89	-0.039
leucine	- 0.20	131.2	5.08	-0.039
isoleucine	- 0.17	131.2	5.08	-0.033
serine	- 0.41	105.1	4.72	-0.087
proline	- 0.02	115.1	4.86	-0.004
phenylalanine	- 0.43	165.2	5.49	-0.078
tryptophan	- 0.29	204.2	5.89	-0.049
-alanine	- 0.06	89.1	4.47	-0.013
glutamine	- 0.43	146.2	5.27	-0.082
asparagine	- 0.61	132.1	5.09	-0.120
tyrosine	- 0.52	181.2	5.66	-0.092
histidine	- 0.40	155.2	5.37	-0.074
lysine	+ 0.44	146.2	5.27	+0.083
aspartic acid	- 1.20	133.1	5.10	-0.235
glutamic acid	- 1.18	147.1	5.28	-0.223

图1

Relationship Between Calculated mobility and Observed Mobility (Proteins)

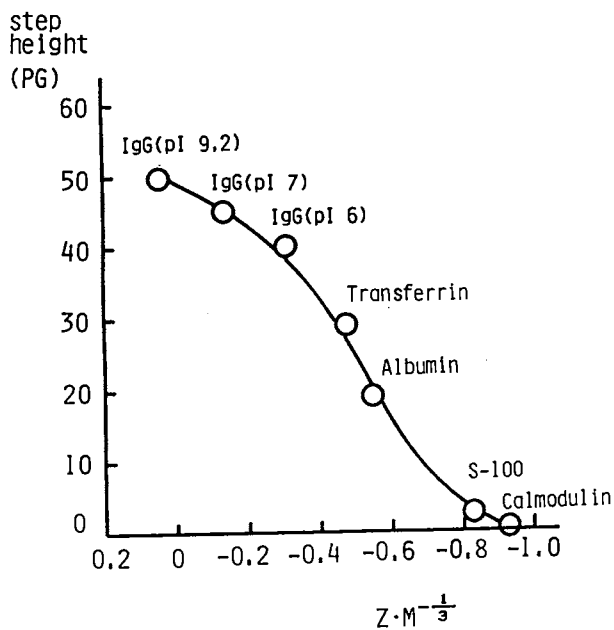
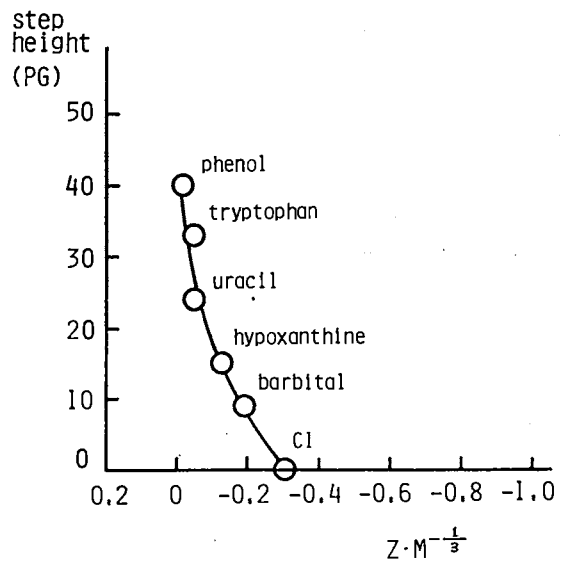


图2

Relationship Between Calculated Mobility and Observed Mobility (pI markers)



18 等速電気泳動法による

タンパク質の陽イオン分析

(島津・応技) ○八木 孝夫・児嶋 佳世子

1. 等速電気泳動法によるタンパク質の分析に関して、数多くの報告が見られるようになってきた。¹⁾ 特に血清タンパクは Delmotte²⁾の方法により、陰イオンとして分析されている。この方法ではターミナルイオンの ϵ -アミノカブロン酸 (EACA) よりも、低移動度のタンパク質が検出されないとされている。このため、より低移動度のターミナルイオンを見いだす努力がなされている。しかし、pH 8~9 近辺において、 OH^- の移動度が約 $10 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \cdot \text{V}^{-1} \cdot \text{s} \cdot \text{e} \cdot \text{c}^{-1}$ と EACA のその値に近く、チャート紙上に記録される電位勾配信号は OH^- と EACA の混合したものと考えられる。このことは、 OH^- よりも低移動度の化合物をターミナルイオンとして用いても、 OH^- に規制されるため意味のない事になる。よって、タンパク質の陰イオン分析では等電点 (PI) が約 8 以上のものは対象にならない。

演者らは、陰イオン分析のできない PI の高いタンパク質を陽イオンとして、泳動分離すると共に、血清タンパクを陽イオンとして分析する条件を検討したので報告する。

2. 装置は島津細管式等速電気泳動分析装置 IP-2A 型、検出器として、UVD (280 nm) と PGD を併用した。泳動管は I.D. 1.0 mm \times L. 50 mm + I.D. 0.5 mm \times L. 150 mm、泳動電流は 125 μ A (8 min) \rightarrow 50 (or 25) μ A、チャートスピードは 40 mm/min した。リーディング液に、5 mM-酢酸ナトリウム + 酢酸 (pH 5.5)、5 mM-水酸化ナトリウム + MES (pH 6.2)、5 mM-酢酸ナトリウム + BES (pH 7.0) を用いた。ターミナル液に 7 mM-酢酸または 10 mM- β -アラニン (β -Ala.) + 酢酸 (pH 4.0) をもちいた。スペーサーイオンにアンフォライン[®] pH 5~8, 8~9.5, 9~11, の各 1% 水溶液を単独で用いるか、アルギニン (Arg.)、ヒスチジン (His.)、EACA、 γ -アミノ酪酸 (GABA)、および β -Ala. の各 1 mg/ml 水溶液と混合してもちいた。

3. 陽イオン分析では H^+ が陰イオン分析における OH^- と同様に、pH が上昇するに従って移動度が小さくなる。一般にターミナルイオンとして用いられる EACA、GABA、 β -Ala. と H^+ の移動度の関係を pH 5.5~7.0 の間で調べた。 H^+ の電位勾配値は pH 5.5 において、三者よりも小さい。pH 6.2 では EACA よりも大きくなり、pH 7.0 では β -Ala. の次に位置する。しかし、泳動順序はこの pH 範囲では三者のいずれよりも後にあり、移動度が低いことを示している。図. 1 に pH 6.2 における各イオンのイソタクソグラムを示す。pH 7.0 において、 β -Ala. をターミナルイオンとすると、電気抵抗の上昇が大きく、通電性が悪い。けれども、 H^+ をターミナルイオンとし、あらかじめ試料に β -Ala. を混合して、

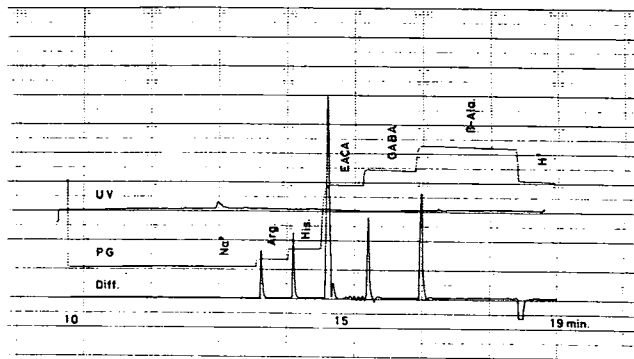


図. 1 H^+ をターミナルイオンとする陽イオンの分析

分析を行うと β -Ala. の電位勾配値まで検出でき、 β -Ala. をターミナルイオンとしたのと同様になり、 H^+ よりも電位勾配値が大きく、 β -Ala. よりもその値が小さい化合物を検出でき、しかも、通電性は良い。 H^+ をターミナルイオンとした場合の各イオンの導入量とゾーン長の関係を調べたところ、両者に比例関係が得られ、定量性が確認できた。

血清タンパクの分析には、血清量 $1 \mu l$ 、スパーサーイオン溶液〔1%アンフォライン pH 5~8 水溶液 + Arg.、His.、EACA、GABA、 β -Ala. の各 $1 mg/ml = (5+1) \times 5 \mu l$ を分析装置に連続して導入するのが適している。リーディング電解液は pH 6.2 を採用した。

リーディング電解液への HPMC の添加によるタンパク質の分離状態はイソタコフェログラム上無添加の場合とほとんど変化が無く、無添加でも十分な分離が得られる。これは pH が 7 以下にあり、電気浸透の影響が少ないためと考えられる。また、HPMC とタンパク質の相互作用も見られない。

UV D 信号として得られた化合物がタンパク質か否かを調べるために、マイクロウエーブ法³⁾により除タンパクを行い、その上清を分析に供したところ、UV 吸収物質は全て消失した。

図. 2 にリーディング液の pH 6.2 における血清タンパクの分析例を健常人、骨髄腫患者について示す。この分析条件ではアルブミンは検出されない。IgA 型骨髄腫患者血清タンパクのイソタコフェログラムから、IgA の位置が明らかになり、P14.8~5.6 の近傍のタンパク質を示すものと考えられる。IgG 型骨髄腫患者血清のイソタコフェログラムから、IgG の位置が推定できる。この IgG はセルロースアセテート膜電気泳動法でスロー γ 位にピークがみられる。

その他、リゾチーム、チトクローム C、ヘモグロビン、インシュリンなどについて、陽イオン分析を行った。

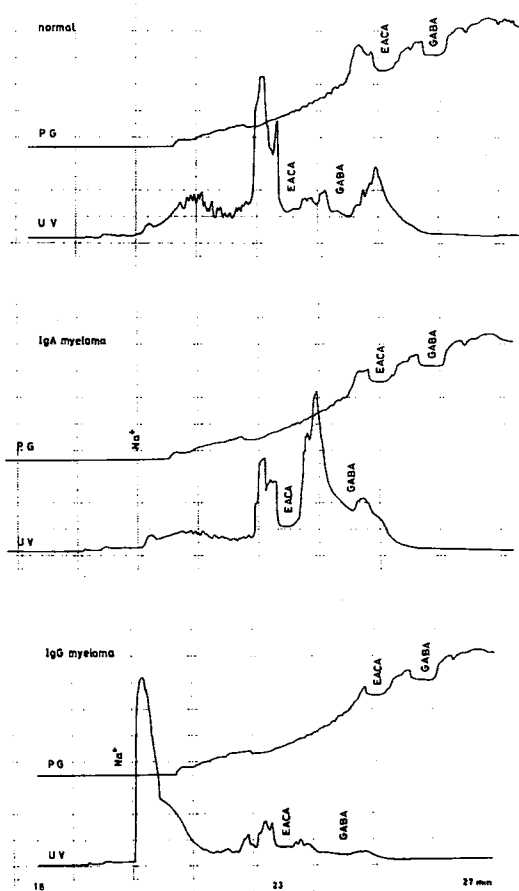


図. 2 血清タンパクの陽イオン分析

参考文献

- 1) 第3回イソタコシンポジウム講演要旨集 (1983)
- 2) P. Delmotte, Sci. Tools 24, 3, 33 (1977)
- 3) T. Yamada, et al.; Acta. Med. Okayama 36, 5, 399 (1982)

キリン(株) 分析研究所
 希田久美, 三野隆男, 古藤 浩

1. 緒言 品質の向上に際しては、検査の標準化が重要である。揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。揮発性染料は、揮発性染料の混合物である。揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。

2. 方法 (1) SDS-シリカプレートに薄層クロマトグラフィー ① 検出剤として、揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。

② 分離剤として、揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。

3. 結果 ① 揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。

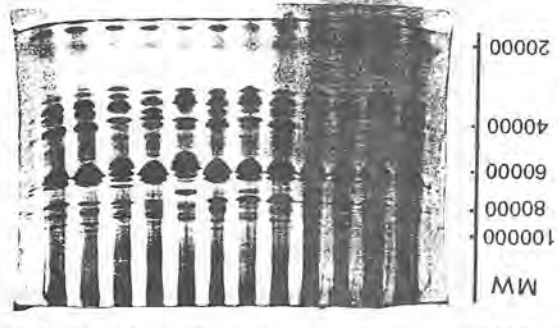


Fig. 1 SDS-シリカプレートに薄層クロマトグラフィー

揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。揮発性染料の分離と検出は、薄層クロマトグラフィーによる。

Fig.2

あまぎ二条

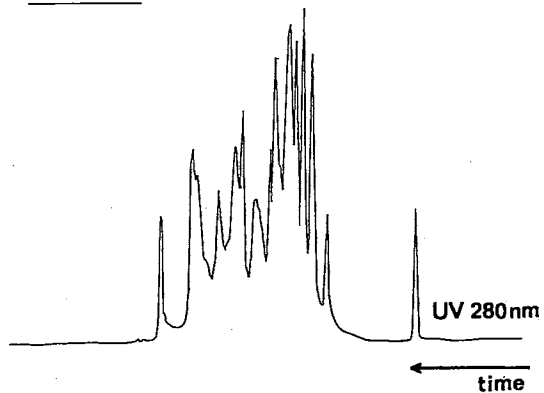


Fig.3

アズマゴールド

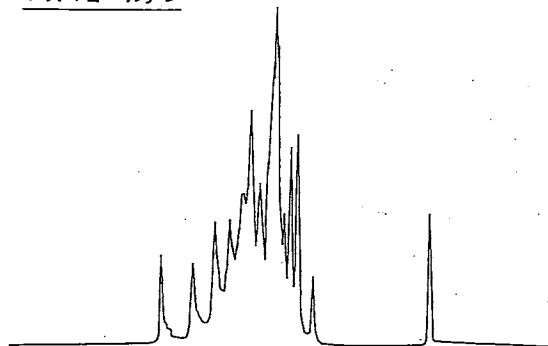


Fig.4

成城17号

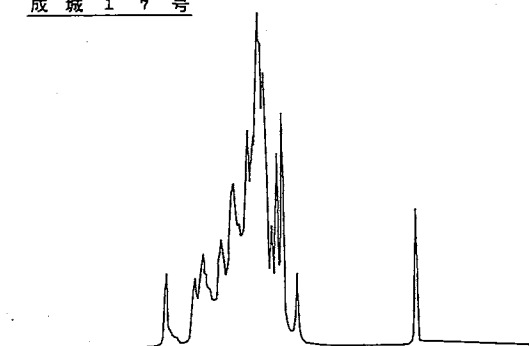
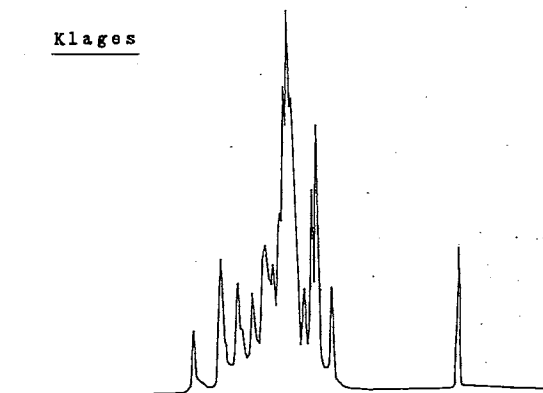


Fig.5

Klages



20 細管式等速電気泳動法による動物およびヒトの鼻汁蛋白成分の研究

○奥泉仁一・田中健一（東レ・安全研）・吉田治弘・池本卯典（自治医大）

1. 目的

細管式等速電気泳動法は、現在、いろいろな分野で高速液体クロマトグラフィ、ガスクロマトグラフィと並んで使用されるようになりつつある。これは試料の定量に関して前処理が簡単で、微量のサンプルを短時間のうちに多数の分析が可能であり、且つ再現性に富むなどの特徴があるためである。従来、細管式等速電気泳動法により、血清を試料として蛋白質のパターンを分析した結果はいくつか報告されているが、動物およびヒトの鼻汁を用いて、泳動パターンを分析をし対比した報告は、国内、国外ともにみられない。

化学物質を取り扱う労働環境下において、しばしば喘息様症状を作業者に惹起させることで知られている¹⁾ Toluene Diisocyanate (以下TDIと略す)を用い、これを有機溶剤に溶解させたものをモルモット鼻前庭部分に塗布したところ、動物に5分前後をピークとし呼吸困難やクシャミ、おびただしい涙液と多量の鼻汁など、人の鼻アレルギーと類似した症状を起すことが観察された。

そこで、TDIによるモルモット鼻アレルギーモデルから得られた鼻汁の蛋白成分と、さらにヒトでアレルギー性鼻炎と診断されている患者の鼻汁とを対比して、細管式等速電気泳動法による鼻汁中蛋白成分の電気泳動的解析を試みた。

2. 実験材料および方法

2-1. 実験動物

静岡県実験動物農業協同組合から購入したHartley系雄性モルモット(体重300~600g)を用いた。動物は、空調された飼育室で健康状態の確認および馴化のために1週間の予備飼育を行った後、実験に供し、固型飼料(CG-3、日本クレア株式会社)および飲料水は自由に摂取させた。

2-2. 検体

実験に用いたTDI(片山化学製)は、2.4TDIと2.6TDIとの混合比4:1のもので、それに酢酸エチル(和光純薬製)に、その都度溶解させて作製した。

2-3. 対象及び試料

モルモット鼻アレルギーの惹起は、既報の²⁾喘息作成法に準じて行った。すなわち、極細耳鼻科用綿棒の先端を10%TDI溶液に浸漬し、左右の鼻腔に5 μ lずつ、1日1回連続5日間モルモットに塗布し、塗布後1日目、3日目および5日目の鼻汁を採取し電気泳動に用いた。

ヒト鼻汁の試料としては、東レ診療所においてアレルギー性鼻炎の臨床診断を受けた患者20例より得られた水様性鼻汁を用い、また、対照には感冒症候群と診断された10例の患者から得られた、膿性で粘稠度の高い鼻汁を試料として実験に供した。

2-4. 鼻汁中好酸球の検討

モルモットより、塗布後おびただしくみられた鼻汁をスライドに採取し、ハンセル染色液(鳥居薬品製)で染色、鼻汁中の好酸球の検討を行った。

ヒト鼻アレルギー患者より得られた水様性鼻汁にも同様の操作を実施した。

2-5. 細管式等速電気泳動法

細管式等速電気泳動は、島津IP-2Aを使用し分析した。電解液は、日根(1982)のリーディング液(L)、5mM HCl、10mM Ammediol - 0.1%HPMC、PH 8.95とし、ターミナル液(T)として、10mM ϵ -ACA - 10mM Ammediolの混合液と、Ba(OH)₂でPH 11.0に調整した。

スプレー溶液には、Valine Glycine, Tricine, Aspartic acid, Leucine, Glutamic acid, β -alanineを各10 μ g/10mlの0.4ml、PH 3.5~9.5のAmyholine 50 μ lを溶解し、蒸留水で1mlとした。スプレー溶液30 μ lに試料10 μ lを加えて混合し、1 μ lを分析した。

通電は、最初の12分間を150 μ A、続いて75 μ Aで16分間行った。分析パターンは、13~28分間の電位差と280nmでのUV吸収を記録し、泳動パターンとしてUV吸収を検討した。

3. 実験結果および考察

モルモット鼻前庭部分にTDIを、耳鼻科用綿棒で塗布するという簡易な方法によって、動物にヒトの鼻アレルギーと同様の症状が観察されることを確認した。特に、ヒトの鼻アレルギーの診断基準となっている鼻汁中の好酸球が、TDI塗布後5日目のモルモット鼻汁中に数多く観察された。また、TDI塗布1日目、3日目および5日目に分泌された鼻汁の、細管式等速電気泳動像を比較してみると、まず、鼻汁特有と考えられる第1、第2、第3の著しく高いピークが、それぞれPH3.0～4.0の酸性領域に認められ、そのうち、特に5日目の鼻汁のピークには、他より強い活性が認められた。とりわけ、第3ピーク(a)、(b)、(c)のうち、(b)ピークの泳動パターンが特に強い活性を示す点で注目された。

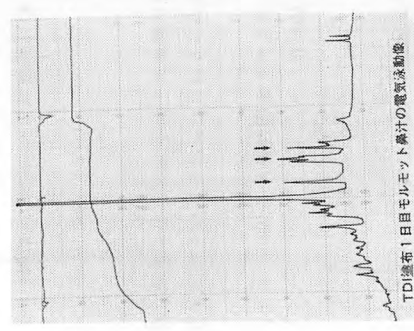
同様にそのパターンは、ヒト鼻アレルギー患者より得られた水溶性鼻汁を試料として泳動した場合にも、モルモット鼻アレルギーモデルよりもいくらか活性は低いが、同様の領域における3本のピークとして認められた。しかし、対照として、ヒトより採取され感冒症候群と診断された粘稠度の高い鼻汁の泳動像には、鼻アレルギー鼻汁の泳動像には、鼻アレルギー鼻汁の泳動像に、ピークを、まったくめなかつた。

以上の実験成績は、我々によって作成された鼻アレルギーモデルと、ヒトの鼻アレルギーとの発症機序に、共通性のあることを示唆するものと注目される。また、モデルの5日目の鼻汁中には、多数の好酸球が観察され、組織像にも分泌亢進、粘膜浮腫と共に肥満細胞の脱顆粒を示唆する像等が認められていることから興味深い。

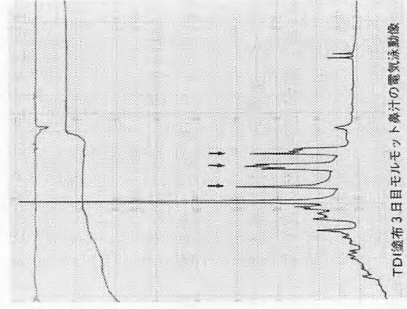
現在、酸性領域に存在する3本の泳動パターン、化学的性状およびTDI暴露によるヒト鼻アレルギー鼻汁の蛋白成分との関連について検討中である。

文献

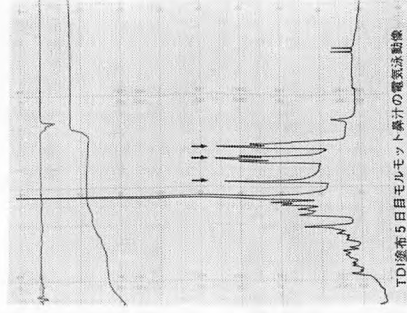
- 1) National Institute Occupational safety and Health : Criteria for a recommended standard Occupational exposure to toluene disocyanate (1973)
- 2) 田中健一 ; アレルギー-31, 1004-1007 (1982)



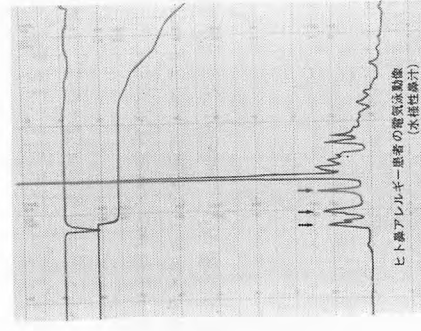
TDI塗布1日目モルモット鼻汁の電気泳動像



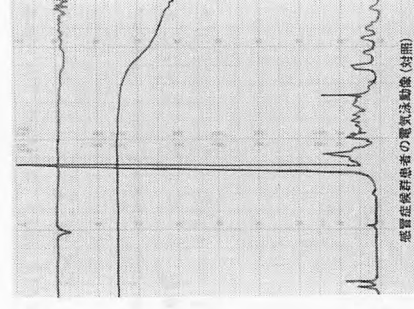
TDI塗布3日目モルモット鼻汁の電気泳動像



TDI塗布5日目モルモット鼻汁の電気泳動像



ヒト鼻アレルギー患者の電気泳動像
(水溶性鼻汁)



感冒症候群患者の電気泳動像(対照)

21 細管式等速電気泳動法によるヒト及びウマ血清のTf型の遺伝的多型性の検討

※
(自治医科大学 法医学教室・人間生物学研究室)

○ 吉田治弘・池本卯典・富田功一

細管式等速電気泳動法により血清蛋白質の遺伝的多型性の判定が可能なのは第3回のシンポジウムでイヌ血清ハプトグロビンについて報告した。今回は前報と同様の条件で、ヒト血清及びウマ血清を分析したところ、トランスフェリン型の遺伝的多型性を簡便に判定できたので報告する。

材料及び方法：分析に供したヒト血清は栃木県在住者及び高齢者集団の遺伝子構成の調査を実施した沖縄県八重山郡竹富町小浜島住民より採取した。また、ウマ血清は栃木県内に飼育されている軽種馬より採取した。

細管式等速電気泳動装置は島津IP-2A型を使用した。分析はリーディング液に5mM塩酸-10mMアミノカプロン酸-0.2% HPMC-15000 (pH8.95)、ターミナル液には10mM ε-アミノカプロン酸-10mMアミノカプロン酸を水酸化バリウムでpH10.8に調整して使用した。カラムはプレカラムに1φ×10cmとし、分析用カラムは0.5φ×30cmを使用した。試料はアミノ酸溶液(バリン、グリシン、アラニン、トリシン、アスパラギン酸、ロイシン、グルタミン酸、各10mg/10ml)を0.4ml、アンホライン(pH3.5~9.5)を0.05ml、蒸留水0.55mlをよく混和したスパーサー溶液30μlに、血清を10μl加え、混和した後、1μlを分析に供した。通電はまず125μAで15分間行ない、続けて75μAで12分間通電した。測定は電位差と280nmのUV吸収を17分から4cm/分のスピードで記録した。

結果：

1) ヒト血清トランスフェリン型

細管式等速電気泳動(以下CITPと略称)で、ヒト血清を分析すると、図1に示す様にPre-alb、Alb、Tf、IgM、IgGなどの分画が検出される。これらの各分画中、Tfについては図2~4に示す様にTf-BC、-C、-CD型などの遺伝的多型性を簡便に判定することができた。私達はすでに親子鑑定にTf-BC型を、小浜島の調査試料に11名のTf-CD型を見出ししている。また、極めて稀なTf-BD型の家系調査も行っている。しかし、一般的に日本人ではTf-C型の出現頻度が約98%と高く、血清中のトランスフェリンに鉄を結合させて、等電点電気泳動法によりさらにTf-C₁、-C₁C₂、-C₂などの亜型に分類され、遺伝標識として有効な情報を提供している。しかし、CITPではTf型の亜型の検出はまだなされていない。CITPもゲル電気泳動法による分離能に劣るものではなく、今後の分析条件の設定では等電点電気泳動法に遜色のない分析能を短時間に達成する可能性も高く、続けて検討している。

2) ウマの血清トランスフェリン型

ウマ血清Tf型は等電点電気泳動法により2本ずつのバンドからなるTf-D、-F、-H、-O、-Rの同型接合型の表現型とTf-DF、-FH、-DO、-DHなどの異型接合型などからなる多種類の表現型を有し、遺伝標識としても利用性は高いものである。CITPでウマ血清を分析すると、Alb、Tf域がヒトに比して若干複雑なパターンを呈し、Alb型の多型性の検出できる可能性も示唆された。Tf型についてはTf型既知のウマ血清を検討したところ、Tf域のピークをチェックすることで多型性判定はほぼ可能であった。同様にして多数例を分析したところ、再現性に秀れた分析パターンを得た。即ち、65頭についてTf型を検討したところ、11の表現型に分類され、いずれも従来の表現型判定結果に一致していた。

以上のようにヒトとウマの血清Tf型の判定はCITPによって特別の前処理を必要とせず、短時間に可能であった。

図1 ヒト血清の分析パターン

