

血清分画 (Cohn fraction VI) から得られる Donaggio 反応陽性物質に関する研究

岡山大学医学部公衆衛生学教室

大 森 祥 夫

(昭和55年12月19日受稿)

(緒方正名教授指導)

Key words: Donaggio 反応
Cohn fraction VI
 α_1 -acid glycoprotein

緒 言

尿を使った、スポーツや肉體疲労に伴う生体負担度を定量的に分析する方法の一つに、Donaggio 反応 (以下 D 反応と略) があり、以前より一般的な方法として広く使用されてきた。

加熱除蛋白下において、D 反応陽性をもたらす物質については緒方・望月¹⁾、加美山・道岡²⁾、Poortmans³⁾そして著者⁴⁾は α_1 -acid glycoprotein (以下 α_1 -AG と略) がその主たる物質として同定した。しかし純粋な α_1 -AG の単品は入手し難く、 α_1 -AG のみを使ってその D 値を求めることは困難であった。

著者は低温低イオン強度アルコール分別法⁵⁾ (Cohn's fractionation) を用いて得られた人血清 Cohn VI 分画 (以下 Cohn fr. VI と略) 中に有する α_1 -AG と α_2 -globulin を生澱粉を用いた電気泳動によって分離し、得られた純度の高い α_1 -AG を使って D 値を求めたのでこれを報告する。

方 法

1. Cohn fr. VI

α -globulin (以下 glob. と略) を約93%含有する Cohn fr. VI は SIGMA[®] 製 (No. G 2134) を使用した。その50mgを水溶し、酸性加熱除蛋白して albumin (以下 alb. と略) を除去した。その後生澱粉に溶解し Fig 1. の sample の所へ

注いだ。

2. Cohn fr. VI の分離

α -glob. 中に主として含有される α_1 -AG 及び α_2 -glob. の分離には生澱粉を用いた zone electrophoresis⁶⁾ を使用した。その分離法の詳細は前報⁷⁾と同様である。

3. 抽出

泳動後1cm幅に切断した生澱粉を微アルカリ溶液 (pH=8, NaHCO₃液) で2度抽出し、蛋白量を測定した (後記4)。そしてD反応測定のため凍結乾燥法によって濃縮使用した。

4. 蛋白量の測定

各々の section からの抽出液について、蒸留水に溶解した Cohn fr. VI を対照として、Lowry⁸⁾ の方法によって測定した。

5. D 反応値の測定

3.により凍結乾燥した抽出液を再び水溶し D 値を測定した。使用した D 反応は前報⁹⁾と同様である。厳密に検討するため溶液は1.3倍稀釈とした。

6. 含有蛋白の同定

加熱後の Cohn fr. VI の水溶液について (濃度 5 g/dl 程度に溶解) してセルロース・アセテート膜電気泳動及び免疫電気泳動で分離した。使用した方法は前々報⁴⁾と同様である。使用した標準血清は Behring[®] Standard Human Serum を、抗血清は抗ヒト全血清 (ウサギ血清, Hyland[®] Co. 製) を用いた。

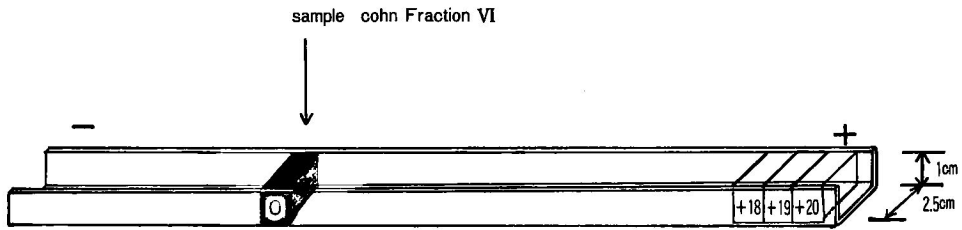


Fig.1 生澱粉を使用した電気泳動(模式図)

2. によって分離された section の蛋白成分を定性的に同定するために、併せて免疫電気泳動法⁴⁾を使用した。

又各 section に含まれる α_1 -AG 量及び α_2 -glob. 領域で主として含有されると推定される α_2 -glycoprotein (α_2 -HS と略), Zn-binding α_2 -HSglycoprotein (Zn- α_2 と略) 量を同定するため一元免疫拡散法⁹⁾ (SRID と略) を使用した。使用した抗血清は抗ヒト単一特異細分画血清 (ウサギ血清, Behring® Co. 製) を使用した。

結 果

1. Cohn fr. VI の分離

生澱粉による zone electrophoresis に

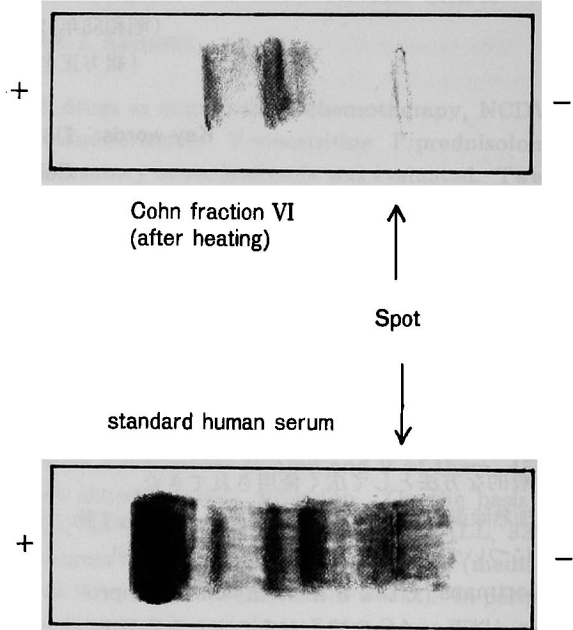


Fig.2 セルロース・アセテート膜電気泳動

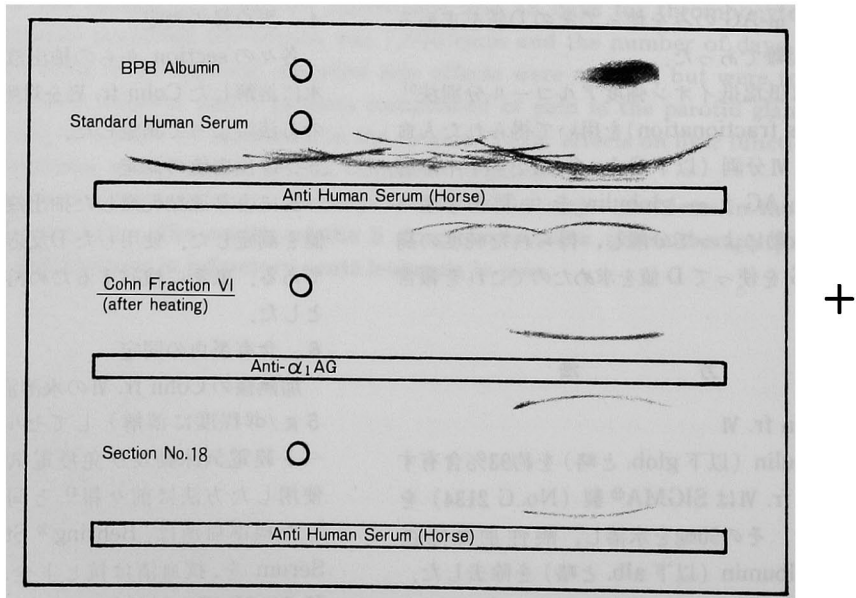


Fig.3 免疫電気泳動

先立って実施した加熱後のfr.VIのセルロース・アセテート膜電気泳動では α_1 -glob.と α_2 -glob.の分離を示した。血清を対象として泳動した結果をFig. 2に示す。densitometry後の α_1 -gl.と α_2 -gl.の比は約3:2であった。

2. 蛋白成分

生澱粉による zone electrophoresis で分離した蛋白を各々の section について抽出し、その蛋白濃度を測定した。SRIDによって各 section の α_1 -AG 濃度及び Zn- α_2 , α_2 -HS 濃度について Tab.1 に示す。Tab.1 に示される様に section No. +18 はほぼ純粋な α_1 -AG を含有するものと推定される。これを免疫電気泳動法によってその成分を確認したが、抗 α_1 -AG のbow 以外に bow

は見られなかった。

同様に section+8 については α_2 -HS がほぼ 86 % 程度を占めるものと推定された。

加熱除蛋白後の Cohn fr. VI には α_1 -AG の他に α_2 -HS については bow が認められ、その含有が確認された。

3. D 値の測定

Cohn fr. VI を単独で水溶したものと、凍結乾燥後の各 section を水溶したものの D 値を 1.3 倍稀釈法で測定した。Tab.1,2 にまとめた。比較のため human albumin についても同様に D 値を測定し、併せて Tab.2 に記した。この Tab. から逆算して、各蛋白 1 mg/dl あたりの D 値(無加熱)を Tab.3 に示した。

Tab.1 各セクションに於ける蛋白量, Donaggio 値

method section No.	total protein	Donaggio 値	蛋白 1mg/dl あたりの Donaggio 値	α_1 -AG	Zn- α_2	α_2 -HS
	Lowry's			S R I D		
	mg/澱粉抽出液 100ml	dilution unit		mg/澱粉抽出液 100ml		
0	0.2	0.2 以下	1.0 以下	0	0	0
+1	0.2	0.2 以下	1.0 以下	0	0	0
+2	0.3	0.2 以下	0.7 以下	0	0	0
+3	0.5	0.2 以下	0.4 以下	0	0	痕跡
+4	0.7	0.3	0.4	0	0	0.4
+5	0.6	0.5 ~ 0.3	0.6 ~ 0.8	0	0	0.4
+6	0.8	0.5	0.6	0	痕跡	0.8
+7	1.2	1.0	0.8	0	痕跡	1.2
+8	2.1	1.3	0.6	0	痕跡	1.8
+9	2.8	1.3 ~ 1.8	0.5 ~ 0.6	0	痕跡	1.6
+10	1.6	1.0	0.6	痕跡	痕跡	1.0
+11	0.3	0.3	1.1	痕跡	0	0.2
+12	0.8	1.0 ~ 1.3	1.2 ~ 1.6	0.2	0	0.2
+13	0.8	1.0 ~ 1.3	1.2 ~ 1.6	0.5	0	痕跡
+14	0.9	1.3	1.4	0.5	0	0
+15	2.0	4.2	2.1	0.8	0	0
+16	2.8	5.6	2.0	1.7	0	0
+17	2.8	5.6	2.0	2.2	0	0
+18	4.8	7.5 ~ 10.0	1.6 ~ 2.1	4.7	0	0
+19	3.1	4.2	1.4	2.8	0	0
+20	0.5	1.0	2.0	0.4	0	0

痕跡 < 0.1

Tab.2 1.3倍稀釈に於ける Donaggio 反応

原液 \ 稀釈	1.3 ⁰	1.3 ⁻¹	1.3 ⁻²	1.3 ⁻³	1.3 ⁻⁴	1.3 ⁻⁵	1.3 ⁻⁶	1.3 ⁻⁷	1.3 ⁻⁸	1.3 ⁻⁹	1.3 ⁻¹⁰
section No.18 4.7mg/澱粉抽出液 100ml	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-	-
Cohn fraction VI 10mg/aq 100ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	±	-
human albumin 10mg/aq 100ml	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

Tab.3 各蛋白 1 mg/dlあたりの Donaggio 値

	Donaggio 値
human albmin	0.9
α_1 -AG	1.6~2.1
α_2 -HS	0.8
Cohn fraction VI	1.2

考 按

D 反応について考えると、殆んど純粋の α_1 -AG 溶液で占められていると考えられる section No.18 について、その抽出水溶液（凍結乾燥したものを再び更に水溶したもの）では 0.47~0.63 mg/dl の稀釈まで D 反応が存在した。即ち α_1 -AG 1 mg/dl あたりの D 値は計算上 1.59~2.13 程度である。Tab.2 に示す様に Cohn fr. VI 及び human albumin を水溶した液で D 値を測定すると各々蛋白 1 mg/dl あたり Cohn fr. VI で 1.2, alb. で 0.9 程度である。この結果は著者の前報⁷⁾の結果とほぼ一致している。

一方溶解液に D 値を示さない（即ちその溶解液の D 値が 1 を示さない）限外濾過尿を使用すると、各 section の D 値は Tab.1 に示す値より上昇する可能性がある。この理由については今後検討する必要がある。

運動後尿中 D 反応について、酸性（酢酸酸性）加熱（100℃ 10分間）除蛋白後、著者たちが得た成績¹⁰⁾では 1.29/mg/dl であった。今回の Cohn fr. VI での成績と一致するものである。

Tab.3 に示す様に単位重量あたり α_1 -AG より

Cohn fr. VI の方が D 値は低いということは、間接的ながら D 値は α_1 -glob. > α_2 -glob. であるということを証明することであると考えられる。これは前報⁷⁾の生体負担後尿で得た成績とよく一致する実験結果である。

alb. は α_1 -AG より D 値はやや低い値を示すがこの理由は今後検討を要する。同様に Cohn fr. VI の値は α_1 -AG, α_2 -HS の値より計算上やや低い値を示した。D 値測定の際 1.3倍稀釈法を使用した。今後分光光度計による精密測定を採用し検討する必要があると思われる。

結 語

1. Cohn fr. VI を生澱粉電気泳動にて泳動分離しほぼ純品の α_1 -AG を得た。 α_1 -AG の水溶液 1 mg/dl あたりの D 値は加熱除蛋白後 1.6~2.1 程度であった。
2. 同様に加熱除蛋白後の Cohn fr. VI 全体では 1.2, human alb. では 0.9, 更に α_2 -HS では 0.8 程度と推定された。
3. Cohn fr. VI 中に含まれる α_1 -glob. と α_2 -glob. では D 値は α_1 -glob. > α_2 -glob. であることが証明された。
4. 運動後尿の酸性加熱除蛋白した状態（酢酸酸性 pH = 5, 100℃ 10分間）と Cohn fr. VI の D 値は、その蛋白単位重量あたり殆んど等しかった。

稿を終えるに当り、御指導、御高聞を賜った恩師緒方正名教授に深甚の謝意を表す次第でございます。

文 献

1. 緒方正名, 望月義夫: 濾紙電気泳動による尿蛋白質および Donaggio 反応, 赤松神明反応陽性物質に関する研究, 日本衛生学雑誌, **13**, 181~187, 1958.
2. 加美山茂利, 道岡 攻: ドナジオ反応の本態に関する研究, 産業医学, **19**, 488~489, 1972.
3. Poortmans, J.R.: Further studies on thermosoluble proteins in serum and urine. *Clin. Chim. Acta* **30**, 671~678, 1970.
4. 大森祥夫: 運動後尿 Donaggio 反応陽性物質の同定, 体力科学, **27**, 117~123, 1978.
5. Cohn, E.J., Strong, L.E., Hughes, W.L., Mulford, D.J., Ashworth, J.N., Melin, M. and Taylor, H.L.: Preparation and properties of serum and plasma proteins IV. A system for the separation into fractions of the protein and lipoprotein components of biological tissues and fluids. *J. Am. Chem. Soc.* **68**, 459~475, 1946.
6. 中村 弘: 電気泳動実験法 第4版 生澱粉を用いた電気泳動法, 文光堂, 東京, pp.191~210, 1965.
7. 大森祥夫: 生体負担時の尿中蛋白(特に熱可溶性蛋白)及びその Donaggio 反応について, 岡山医学会雑誌, (投稿中). **92**, (9, 10), 1007~1014, 1980.
8. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 263~275, 1951.
9. Mancini, G., Carbonara, A.O. and Heremans, J.F.: Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. *Immunochem.* **2**, 235~245, 1965.
10. Ogata, M., Ohmori, S.: Identification of Donaggio reaction positive substances and increase of α_1 -acid glycoprotein in urine after exhaustive exercise. *Ind. Health.* **16**, 95~102, 1978.

**Donaggio reaction positive substances
derived from serum protein (Cohn fraction VI)**

Sachio OHMORI

Department of Public Health, Okayama University School of Medicine

(Director : Prof. M. Ogata)

Up to date Donaggio reaction positive substances derived from serum protein have been shown to be from the α_1 -globulin region, mainly α_1 -AG. One purpose of this study was to purify α_1 -AG from Cohn fraction VI of human serum by means of starch block electrophoresis and to measure the Donaggio titer in it. The other purpose was to compare α_1 -AG with the other protein subfraction.

The results were:

- 1) Pure (about 98%) α_1 -AG was obtained from Cohn fraction VI after heating. The Donaggio titer of α_1 -AG solution was 1.7 ~ 2.2/mg/dl. Whole Cohn fraction VI was 1.2, human albumin was 0.7 and α_2 -HS was 0.8.
- 2) The Donaggio specific activity was indirectly proved to be in the order of α_1 -globulin > α_2 -globulin contained in the Cohn fraction VI. This result supports the previous report.
- 3) A solution of Cohn fraction VI was almost equal in Donaggio titer per the same concentration of protein to urine after exercise, after treatment by heating at 100°C for 10 minutes and acidification to pH. 5 by acetic acid.
- 4) α_1 -AG was concluded to have the highest Donaggio titer of the whole protein subfraction.