

Cellulose Acetate 膜電気泳動法におけるイヌの体液 タンパク質に関する研究

鈴木 實*・七條喜一郎*・竹内 崇*・斎藤俊之**

平成2年5月31日受付

Studies of Body Fluid in Dogs by Cellulose Acetate Electrophoresis

Minoru SUZUKI*, Kiitiro SITIZYO*, Takashi TAKEUCHI*,
Toshiyuki SAITO**

The concentrations of protein in body fluids (serum, pericardial fluid, pleural fluid, ascites, articular fluid, vitreous humor, aqueous humor, urine) were analyzed in 10 healthy dogs and 4 abnormal dogs by using cellulose acetate electrophoretic methods.

The amounts of serum total protein in body fluids in normal dogs were: serum 6.1 ± 0.6 g/dl, ascites 2.4 ± 0.5 g/dl, pericardial fluid, pleural fluid and articular fluid $1.7 \sim 2.4$ g/dl, aqueous humor and urine $3.2 \sim 84.1$ mg/dl.

Protein components of pericardial fluid, pleural fluid, ascites and articular fluid showed a significantly higher albumin (70%) and significantly lower γ -globulin (0.8~2.0%) by cellulose acetate electrophoresis. Concentrations of albumin and γ -globulin in vitreous humor and urine were very low (albumin 5.3~18.0%, γ -globulin 4.6~6.7%).

Bence Jones protein or pre-albumin (low molecular weight protein) were observed on electrophoretic patterns of urinary proteins in the abnormal dogs.

緒 論

血清及び血漿タンパク質成分は単に血管内に存在するばかりでなく、正常状態においても血管壁を通過して、組織液、関節液、脳脊髄液、眼房水、尿その他の分泌液

などの血管外の体液中にも広く分布している。しかもこれらの体液タンパク質は常に血管内外でリンパ液を介して交換される。したがって、組織あるいは器官に病的異常が生じた場合、その部位の体液成分が変動するため、ヒトの臨床診断には体液タンパク質の分析も盛んに行わ

* 鳥取大学農学部獣医学科家畜生理学教室

* Department of Veterinary Physiology, Faculty of Agriculture, Tottori University

** 鳥取大学農学部獣医学科家畜薬理学教室

** Department of Veterinary Pharmacology, Faculty of Agriculture, Tottori University

れている。すなわち、腎臓疾患における尿タンパク質検査^{2, 15)}、神経系疾患における脳脊髄液検査^{3, 8, 10)}、関節リュウマチにおける関節液検査^{2, 15)}及び唾液検査¹⁶⁾など多数の研究がなされている。

一方、動物の体液に関する報告は比較的少なく^{1, 4, 6, 14)}、イヌの関節液、脊髄液、眼房水などのタンパク質について電気泳動法で検索した報告はほとんど見当たらない。そこで本実験では、体液タンパク質の分析を動物の臨床診断に応用するための基礎的資料を得る目的で、一般検査上健康なイヌの尿、胸水、腹水、心膜液、眼房水及び硝子体液のタンパク質を Cellulose acetate 膜電気泳動法 (CA膜法) で分析した。また、脳波測定のために頭蓋骨に慢性埋め込み電極を装着したイヌ及びフィラリアに感染したイヌの腹水及び尿タンパク質についても検索した。

実験方法

体液タンパク質の生理値の測定には6カ月齢の雑種イヌ10例を用いた。試料の採取は Pentobarbital 麻酔下で行い、胸水及び腹水は開胸並びに開腹して貯留液を注射器に吸引した。また、心膜液、眼房水、硝子体液並びに関節液はそれぞれ穿刺して採取し、尿はカテーテルを用い、採血は伏在静脈より行った。

採取した体液試料は2,000rpmで20分間遠心分離して細胞成分を除去して凍結保存した。尿は Polyvinyl pyrrolidone (PVP) で500~1,000倍に透析濃縮した。また、眼房水は Lyphogel (和光純薬KK) で5~10倍に濃縮し、硝子体液及び関節液は Hyaluronidase 処理して眼房水と同様に濃縮した。

血清総タンパク質量 (TP量) の測定はアタゴ製タンパク屈折計で行い、血清以外の体液タンパク質量は紫外外部吸光法で測定した。タンパク質の分画測定は Separax 膜 (富士フィルムKK) を用いて、電気泳動学会標準操作法で行った。

脳波測定のために埋め込み電極を装着したイヌ3例の血清タンパク質及び尿タンパク質についても同様に検索した。電極の埋め込み手術は Pentobarbital 麻酔下で、頭蓋骨に直径約5mmの穴を開けて、銀球電極を歯科用セメント (Carboxylate cement 三金工業) で固定した。血清及び尿の採取は手術前、術後5日目、15日目及び5カ月目に行った。また、フィラリアに感染したイヌ1例の血清、腹水及び尿タンパク質についても検索した。

実験成績

1. 体液タンパク質の濃縮操作が分画値に及ぼす影響
尿や眼房水のように含有するタンパク質量が少ない体

液をCA膜法で分画する場合、試料を濃縮して泳動する必要がある。そこで実験に先立ち、濃縮操作がTP量及びタンパク質分画値に及ぼす影響を検討した。実験にはフィラリアに感染したイヌの腹水を生理食塩水で20倍に希釈した溶液を用い、これをPVPで5~20倍に濃縮した。

Table 1 に腹水原液と腹水希釈溶液を濃縮した5検体のTP量及びタンパク質分画比を示した。なお、腹水希釈液のTP量は測定値に希釈倍率と濃縮率を掛けて原液の値を算出した。その結果、濃縮処理後のTP量は原液に比べて高値を示す傾向がみられ、その測定値のバラツキも大きかった。しかし、タンパク質の分画比では濃縮操作による影響はほとんどみられず、処理後の Albumin (Alb), α -globulin (α -glob), β -glob, γ -glob の各分画値は原液にほぼ一致するものであった。

Table 1 Influence of concentration on the cellulose acetate electrophoresis of ascites in dogs

	Total protein (mg/dl)	Albumin α -glob β -glob γ -glob			
		(%)			
Ascites (origin)	5.8	44.2	9.0	39.2	7.3
Dilution* No. 1	8.3	44.9	9.1	39.7	6.4
No. 2	5.1	44.6	8.1	40.8	6.2
No. 3	7.8	45.9	7.4	41.2	5.2
No. 4	6.3	46.2	8.0	40.4	5.2
No. 5	8.4	47.4	7.4	38.6	6.4

* Diluted ascites with physiological saline to 20 times, and concentrated by polyvinyl pyrrolidone.

2. 各種体液タンパク質の分画値

Fig. 1 に各種体液タンパク質の Densitogram の1例を示した。血清及び腹水タンパク質は Alb, α_1 -glob, α_2 -glob, β_1 -glob, β_2 -glob, γ -glob の6分画に分離された。しかし、心膜液、胸水及び関節液は Alb, α -glob, β -glob, γ -glob の4成分にしか分離しなかった。また、硝子体では Alb 及び γ -glob が極微量で、 α -glob 及び β -glob が主体を占めていた。眼房水及び尿タンパク質は glob 領域の分離が不明瞭であった。

各体液のタンパク質量をみると、血清のTP量が 6.1 ± 0.6 g/dl であるのに対して、腹水では 2.4 ± 0.5 g/dl と血清の約1/2量で、心膜液、胸水並びに関節液のTP量は血清の約1/3、硝子体液のTP量は 0.3 ± 0.1 で血清の約1/15~1/20であった。眼房水及び尿タンパク質のTP量は極めて微量であり、前者は 84.1 ± 28.9 mg/dl、後者は 3.2 ± 1.5 mg/dl であった。(Table 2)

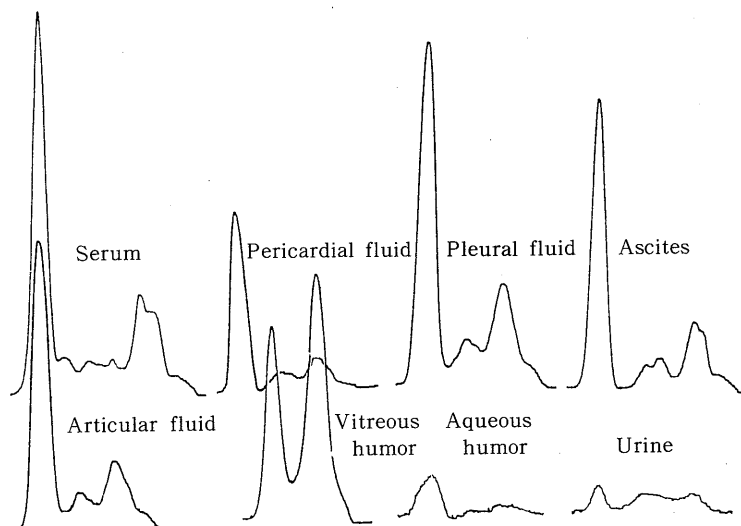


Fig. 1 Cellulose acetate electrophoretic patterns of body fluids normal dogs

Table 2. Components of body fluid protein in normal dogs.

Fluid	Total protein (g/dl)	Protein fraction (%)					
		Ald	α_1 -glob	α_2 -glob	β_1 -glob	β_2 -glob	γ -glob
Serum	6.1±0.6	52.4±6.0	9.5±3.5	12.2±3.3	11.5±5.3	10.2±1.9	3.9±1.2
pericardial fluid	1.5±0.4	73.5±4.3		10.1±2.4		15.3±3.3	0.8±0.8
Pleural fluid	1.7±0.8	68.0±7.4		10.7±2.1		15.1±10.3	2.0±1.2
Ascites	2.4±0.5	65.7±4.3	4.5±1.2	6.3±1.4	12.5±3.2	8.5±1.2	2.0±0.3
Articular fluid	1.9±0.4	69.7±4.0		9.9±1.3		18.0±3.5	2.1±1.2
Vitreous humor	0.3±0.1	5.3±2.6		42.3±4.3		45.4±7.3	6.7±3.1
Aqueous humor	84.1±28.9*	62.2±10.3		17.3±4.3		16.4±6.0	3.7±2.2
Urine	3.2±1.5*	18.0±5.9		49.7±4.5		27.2±6.2	4.6±2.0

* mg/dl Mean ± SD n=10

一方、タンパク質分画値では、心膜液、腹水、関節液及び眼房水は血清に比べて Alb の比率が高く、特に心膜液の Alb は73.5±4.3%であった。これに対して、硝子体液及び尿タンパク質の Alb はそれぞれ平均5.3%、18.0%と低い値であった。また、硝子体液の γ -glob は平均6.7%で血清よりも高値であり、心膜液、胸水及び腹水のそれは約1~2%と低い値であった。

3. 脳波測定用慢性埋め込み電極装着イヌの尿タンパク質

脳波測定のために慢性埋め込み電極を頭蓋骨に装着手術したイヌの術前の血液検査では、いずれのイヌも赤血

球数が400~500万/mm³、白血球数が12,000~20,000/mm³、Hematocrit 値は34~38%で、白血球百分比においても特に異常は認められなかった。

Fig. 2に電極装着手術前から術後5カ月までの血清及び尿タンパク質の Densitogram とその分画比の1例を示した。血清TP量は術後5日目、15日目で減少する傾向がみられ、5カ月後にはほぼ術前の値に復していた。タンパク質の分画値では術後日数が進むにつれて Alb が減少する傾向を示し、5日目及び15日目では α_2 -glob が増加し、5カ月後では β_1 -glob 及び γ -glob が増加した。

術後5日目と15日目の尿タンパク質量は3例とも術前

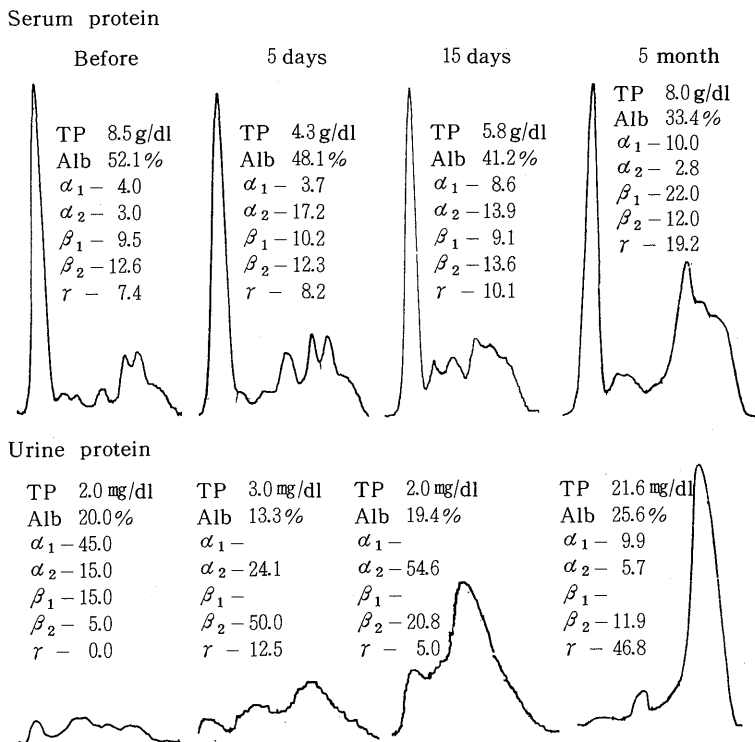


Fig. 2 A case of cellulose acetate electrophoretic patterns of serum and urine protein in a dog with implanted electrode.

とほぼ同様な値であったが、5カ月目には術前の約10倍に増加した。尿タンパク質の分画値は個体によるバラツキが大きく、15日目までは一定の傾向が認められなかった。しかし、5カ月後では各例ともに β -globから γ -glob領域の成分が著明に増加し、Bence Jones タンパク様の分画像を示した。

4. フィラリア感染症の尿及び腹水タンパク質

フィラリアに感染したイヌの血清、腹水及び尿タンパク質のDensitogramの1例をFig.3に示した。このイヌの血液検査では赤血球数510万/mm³、白血球数15,000/mm³、Hematocrit値32.0%であり、血液塗抹標本では好酸球の増加がみられた(18%)。また、多量の腹水貯留が認められ、フィラリア感染による循環障害が疑われ、採取した腹水には赤血球の混入がみられた。

血清TP量は7.8g/dlで、Albが減少し(38.0%)、 β_1 -glob及び β_2 -globの増加(17.3%、25.8%)がみられた。腹水タンパク質は6.0g/dlで、血清に近似しており、Albが45.3%、 α -globが10.4%、 β_1 -globが18.6%、 β_2 -globが20.3%、 γ -globが5.2%であった。

尿タンパク質量は461mg/dlと前述の正常尿に比べて約

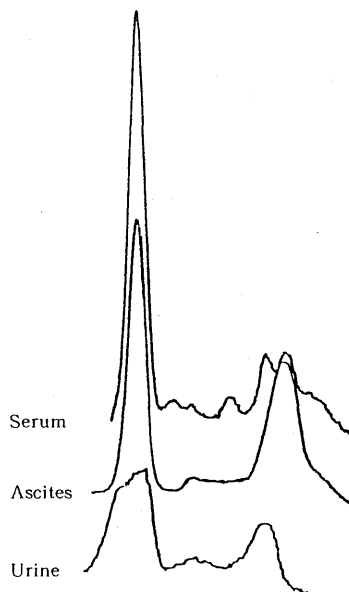


Fig. 3 Cellulose acetate electrophoretic patterns of serum, ascites and urine proteins in dog infected with filaria immitis

100倍の値であった。尿タンパク質の分画像では Alb の陽極側に正常な尿ではみられない分画帯 (Pre-alb) が認められた。分画比では Pre-alb が17.8%で、Alb + α -glob が42.8%と高い値であった。また、 β_1 -glob が12.5%、 β_2 -glob が26.7%であり、 γ -glob は極めて微量であった。

考 察

1. 濃縮操作がタンパク質分画値に及ぼす影響

胸水、腹水、心膜液及び眼房水などのタンパク質量は血清に比べて微量なため、これらのタンパク質をCA膜法で分画するには溶液の濃縮操作が必要である。この場合、濃縮操作方法によってはタンパク質が変性し、分析値に影響を及ぼすことが知られている¹¹⁾。特に、尿や脊髄液のようにタンパク質濃度が極めて低いものでは高倍率に濃縮する必要があり、分析値の再現性が悪くなるものと考えられる。

本実験の腹水希釈液の濃縮試験では分画値に明らかな変動がみられず、PVPによる5~10倍(5時間)の濃縮ではタンパク質分画像に大きな影響を及ぼさないことが明らかになった。しかし、TP量は原液の測定値より高値を示す傾向がみられ、測定値のバラツキも大きかった。このTP量のバラツキは、濃縮時にわずかながらタンパク質の変性がおこり、その変性成分によってタンパク屈折計の屈折率が大きくなるためと思われる。また、本実験におけるPVPによる5時間の濃縮過程で試料の濃縮率が異なっていたことも測定値に差を生じた原因と考えられる。

2. 体液タンパク質の分画測定

著論でも述べたように、生体の組織は血液及び体液成分と密接な関係のもとに正常な機能を維持している。したがって、組織の機能的並びに形態学的な変化は直接その部位の体液成分に反映されることから、体液成分の分析は臨床診断の補助手段として重要であると思われる。特に尿タンパク質は腎臓の機能を直接反映するために、ヒトでは日常の臨床検査に応用され、これに関する報告は多い^{5, 9)}。獣医学領域においても尿タンパク質量の測定は臨床応用されているが、そのタンパク質成分の電気泳動分析はいまだ一般的でない。また、家畜動物の関節液、眼房水、胸水及び腹水などのタンパク質についての報告も少ない。

本実験において、正常なイヌの各種体液タンパク質について検索したところ、心膜液、胸水、腹水、関節液、眼房水及び硝子体液のタンパク質量はヒトで報告されて

いる各体液濃度にはほぼ近似した値であり、また、イヌの尿タンパク質量は Barsanti と Finco¹¹⁾ の報告に一致した値であった。

脳波測定のために頭蓋骨に慢性埋め込み電極を装着したイヌの尿タンパク質では、術後5カ月後の血清で β_1 -glob の増加がみられた。また、この時期の尿には正常尿の約100倍のタンパク尿がみられ、分画像に γ -glob の著明な増加が認められた。この γ -glob の増加は多発性骨髄腫で特徴的にみられる Bence Jones タンパク質⁶⁾ に類似した分画像であった。

したがって、電極装着イヌにみられた尿タンパク質は埋め込み電極を装着するために頭蓋骨を穿孔したことによる骨破壊、あるいは長期間にわたって慢性埋め込み電極を装着したことによるM-タンパク質(monochlonal protein)であろうと推察されるが、このことについては免疫電気泳動法などによって更に詳細な検討が必要である。

腎障害によるタンパク尿には、糸球体基底膜のタンパク質の透過性亢進による漏出性尿タンパク質(糸球体性タンパク尿)と近位尿細管障害による滲出性尿タンパク質(尿細管性タンパク尿)とがある。前者はAlbを主体とする血漿高分子タンパク質が大部分を占め、後者はAlbより低分子のタンパク質が主体を占めることが知られている⁵⁾。本実験のフィラリア感染症の尿タンパク質分画像では、Pre-alb位置に正常尿ではほとんどみられない成分が認められた。このPre-alb成分はその分画位置から推測すると、低分子のタンパク質であろうと思われる。尿細管性のタンパク尿であろうと思われる。しかし、このタンパク質が低分子タンパク質であるかどうかについてはSDS-Poracrilamid gel 電気泳動法などによって更に検討する必要がある。

総括並びに結論

動物の臨床診断に体液タンパク質の分析を応用するための基礎的資料を得る目的で、正常なイヌの尿、胸水、腹水、心膜液、眼房水及び硝子体液のタンパク質をCellulose acetate 膜電気泳動法で分析した。また、脳波測定用に慢性埋め込み電極装着イヌ及びフィラリア感染イヌの尿タンパク質についても検討した。

正常なイヌの体液タンパク質量の平均値は、腹水が2.4 g/dlで、心膜液、胸水及び関節液は1.7~2.4 g/dl、硝子体液は0.3 g/dl、尿及び眼房水は3.2 mg/dl、84.1 mg/dlであった。心膜液、胸水、腹水及び関節液のタンパク質はAlbが約70%を占め、 γ -glob が極めてわずかであった。

また、硝子体液の Alb は5.3%で α -glob 及び β -glob がそれぞれ約45%であった。また、尿タンパク質は Alb が約20%で α -glob 及び β -glob が主体を占めていた。

脳波測定用の電極装着イヌの手術後5カ月目の尿タンパク質は Bence Jones タンパク質様の分画像を示した。また、フィラリア感染症の尿タンパク質には Pre-alb 成分がみられ、低分子タンパク質であろうと推測された。

文 献

- 1) Barsanti, J. A. and Finco, D. R. : Protein concentration in urine of normal dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **40** 1583-1588 (1979)
- 2) Brown, D. L., Cooper, A. G. and Bluestone, R. : Exchange of IgM and albumin between plasma and synovial fluid in rheumatoid arthritis. *Ann. Rheum. Dis.*, **28** 644-651 (1969)
- 3) Cosgrove, J. B. R. and Agius, P. : Studies in multiple sclerosis. I. Normal values for paper electrophoresis of serum and cerebrospinal fluid proteins : description of the method with special reference to a practical concentration technique for cerebrospinal fluid protein. *Neurology*, **15** 1155-1160 (1965)
- 4) Gossett, K. A., Turnwald, G. H., Kearney, M. T., Greco, D. S. and Cleghorn, B. C., : Evaluation of γ glutamyl transpeptidase-to-creatinine ratio from spot sample of urine supernatant, as an indicator of urinary enzyme excretion in dogs. *Am. J. Vet. Res.*, **48** 455-457 (1987)
- 5) 乾 成美・鈴木 誠・後藤 俊・渡辺文彦 : 蛋白尿の電気泳動的研究. *生物物理化学*, **7** 71-74 (1960)
- 6) 河合 忠 : 血漿蛋白その基礎と臨床. 医学書院, 東京 (1969) pp555-559
- 7) Jergens, A. E., McCaw, D. L. and Hewett, J. E. : Effects of collection time and food consumption on the urine protein/creatinine ratio in the dog. *Am. J. Vet. Res.*, **48** 1106-1109 (1987)
- 8) Kolar, O. and Anthony, E.: Cerebrospinal fluid and serum light polypeptide chains in fluid and serum. 160 patients with various nervous system disorders. *Z. Neurol.*, **200** 6-17 (1971)
- 9) 黒川達郎・下川 浩・東原潤一郎 : SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による妊娠、産褥期の尿中蛋白組成の変化に関する研究. *生物物理化学*, **29** 191-195 (1985)
- 10) 真鍋 敬・羽山恵美子・奥山典生 : 人体液蛋白質のミクロスケール2次元電気泳動 —— 血清, 脊髄液, 尿の蛋白質の分析 —— , *生物物理化学*, **25** 161-166 (1981)
- 11) 真鍋 敬・高橋裕子・奥山典生・田中祥子・宮本成雄 : 腎疾患患者尿蛋白質のミクロ2次元電気泳動法による分析. *生物物理化学*, **28** 159-165 (1984)
- 12) 奥山和美・菅野 浩・下条文武・荒川正昭 : 尿細管性蛋白尿の電気泳動分析 —— 免疫反応による泳動成分の同定 —— . *生物物理化学*, **29** 349-354 (1985)
- 13) 中林治夫・柳沢 徹・永森静志・渡辺礼次郎・亀田治男 : 連続濃度勾配ポリアクリルアミドマイクロゲル電気泳動法による微量髄液蛋白の解析. *生物物理化学*, **29** 179-184 (1985)
- 14) Stuart, B. P., Phemister, R. D. and Thomassen, R. W.: Glomerular lesions associated with proteinuria in clinically healthy dogs. *Vet. Pathol.*, **12** 125-144 (1975)
- 15) 鈴田達男・丸本一彰 : 関節液蛋白分析の臨床的意義. *生物物理化学*, **18** 117-112 (1974)
- 16) Tsuchida, S., Nishiumi, E., Yoshida, H. and Ikemoto, S.: Genetic polymorphisms of human parotid salivary proteins, Pa and Pr, detected by micro-two-dimensional-gel electrophoresis. *Physico-Chemical Biology*, **30** 295-300 (1986)