

ラットの血漿タンパク質及びヘモグロビンの 電気泳動分析における運動負荷の影響

七條喜一郎*・三条成泰*・竹内 崇*
鈴木 實*・斎藤俊之**

平成2年5月31日受付

Effects of Load Exercises on Components of Plasma Protein and Hemoglobin by Electrophoretic analysis in Rats

Kiitiro SITIZYO*, Nariyasu SANJYO*, Takashi TAKEUCHI*,
Minoru SUZUKI* and Toshiyuki SAITO**

Changes in plasma protein and hemoglobin due to exercise were studied by cellulose acetate electrophoresis, isoelectric focusing and SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The experiment was carried out on adult male wister rats weighing 206~233g. The method of load exercise used consisted of twenty minutes of swimming. Amounts of plasma protein and hemoglobin increased rapidly immediately after exercise, but there were no significant changes 24 hours after exercise.

- 1) Plasma protein component : The concentration of albumin and $\phi + \gamma$ -globulin increased after load exercise on the cellulose acetate electrophoresis. Fractions of pH 6.0 on the isoelectric focusing slightly increased immediately after exercise.
- 2) Hemoglobin component : Concentrations of fraction II on cellulose acetate electrophoresis and of the fraction of molecular weight 16,000 on SDS-polyacrylamide gel electrophoresis increased immediately after exercise. Significant changes in isoelectric focusing patterns were not observed after exercise.

* 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*

緒 論

著者ら¹⁷⁾は先に、ラットの血液性状及び筋肉 glycogen 並びに乳酸量に及ぼす運動負荷の影響について検索し、20分間の遊泳運動直後に、赤血球数及び hemoglobin (Ht) 値が増加することを報告した。この運動直後に起こる Ht 値の変動は筋肉組織で多量に消費される酸素を輸送するための増加であろうと推察された。また、弘¹⁰⁾はヒトに3分間の運動を負荷した場合、赤血球の浸透圧脆弱化を認め、過酷な運動によって溶血がおこることを示唆した。一方、伊藤^{6, 7)}は運動量に応じて血清総タンパク (TP) 量の変動すると述べ、運動によって血液の濃縮が起こるためであると考えている。

本実験では運動が血液 Hb 及び血清タンパク質に及ぼす影響を更に詳細に検討する目的で、ラットに20分間の遊泳運動を負荷して、Cellulose acetate 膜電気泳動法 (CA 膜法)、薄層 Polyacrylamid gel 等電点電気泳動法 (IEF 法) 及び SDS-Polyacrylamid gel 電気泳動法 (SDS 法) によって検索した。

実験方法

実験には9週齢 (体重206~233 g) の Wistar 系雄ラットを用い、対照群、運動負荷直後群 (直後群)、運動負荷後24時間群 (24時間群) に分けて、それぞれ10例ずつ供試した。動物の飼育方法、採血方法及び運動負荷方法は前法¹⁷⁾と同様に行った。

採血した血液は直ちに遠心分離 (2,000rpm, 10分間) して血漿を -20°C で凍結保存した。また、血球は生理的食塩水で3回洗浄した後、 -20°C で凍結して溶血させ、等量の脱イオン水を加えて2,000rpmで10分間遠心分離し、その上清を Hb の電気泳動測定用試料とした。

血漿総タンパク (TP) 量の測定はアタゴ製タンパク屈折計で行い、Hb量はCyanmethemoglobin法で測定した。血清タンパク質及びHbの分画はCA膜法、IEF法及びSDS法で行った。なお、CA膜法の泳動は電気泳動学会標準操作法で行い、IEF法は間根山ら^{3, 13)}の方法、SDS法は林と大場⁴⁾の方法にそれぞれ従った。

実験成績

A 運動負荷に伴う血漿タンパク質の変動

1) 血漿TP量

ラットの血漿TP量は運動負荷によって増加し、直後群では対照群に比べて有意に高い値を示した。しかし、24時間群では対照群に近似した値であった (Fig.1)。

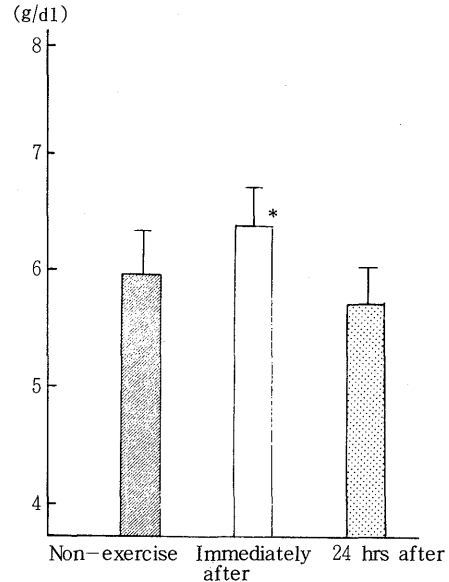


Fig.1. Effects of load exercises on concentration of total plasma proteins in rats. The asterisk shows a significant difference from non-exercise ($P < 0.01$). Mean \pm SD, $n = 10$

2) 血漿タンパク質分画

CA膜法による血漿タンパク質の分画比では運動による影響はほとんどみられなかった (Table 1)。しかし、各分画比にTP量に乗じて算出した分画値の絶対量では、直後群のA1b及び $\phi + \gamma$ -globが対照群に比べて高い値を示した。24時間群ではほぼ対照群に近似した値であった。また、 α -, β_1 -, β_2 -, $\phi + \gamma$ -globは3群の間で明らかな差を示さなかった (Fig.2)。

Fig.3, A にIEF法による血漿タンパク質の泳動図の模式図を示した。供試した全ての血清において、pH4.5からpH8.0の間に明瞭な分画帯が18本認められた。これらのうち、鮮明に濃く染色された4本のbandをそのpH域によってP5.5, P6.0, P6.5, P7.5と仮称した。なお、P6.5は2本のbandに分離する例がみられたが、このような例では両者を合わせてP6.5とした。これら4成分の濃度比をみると、対照群ではP5.5が最も明瞭でデンストメトリ図ではP5.5, P6.0, P7.5, P6.5の順であった (Fig.3, B)。直後群ではP5.5が対照群に比べて明らかに減少し、P6.0のピークが増加した。また、24時間群は対照群と直後群の中間的な泳動像を示し、P5.5, P6.0, P6.5, P7.5の順であった。

SDS法による血漿タンパク質分画のデンストメトリ

Table 1. Changes in concentration of plasma protein in rats due to exercise. cellulose acetate electrophoresis

Group	plasma total protein	Plasma protein fraction (%)				
		Albumin	α -glob	β_1 -glob	β_2 -glob	γ -glob
Non-exercise	5.7±0.2	61.2±4.2 (3.5±0.3)	13.9±2.9 (0.7±0.1)	6.2±0.7 (0.3±0.0)	4.7±0.8 (0.2±0.0)	13.2±1.3 (0.7±0.0)
Immediately after	6.4±0.3	63.5±3.8 (3.9±0.3)	11.9±2.4 (0.7±0.1)	6.0±0.9 (0.3±0.0)	4.6±0.7 (0.2±0.0)	13.1±1.3 (0.8±0.1)
24 hours after	5.7±0.2	61.4±3.5 (3.4±0.2)	14.4±3.1 (0.7±0.2)	6.5±0.8 (0.3±0.0)	5.4±0.7 (0.2±0.0)	11.6±1.4 (0.6±0.0)

SDS-polyacrylamid gel electrophoresis

Group	Plasma protein fraction (%)				
	P ₂₀₀	P ₁₃₀	P ₆₀	P ₂₇	P ₁₄
Non-exercise	15.0±4.9 (0.8±0.2)	12.1±5.1 (0.6±0.3)	67.2±5.9 (3.9±0.3)	3.7±2.2 (0.2±0.1)	3.1±1.4 (0.1±0.0)
Immediately after	16.8±3.2 (1.0±0.2)	14.7±1.3 (0.9±0.1)	55.3±3.4 (3.4±0.3)	7.3±2.6 (0.4±0.1)	5.4±1.3 (0.3±0.0)
24 hours after	10.9±2.4 (0.5±0.1)	11.2±4.2 (0.5±0.2)	65.9±5.6 (3.7±0.2)	6.3±1.6 (0.3±0.1)	5.8±1.2 (0.3±0.0)

Number in the parenthesis indicates absolute volume (mg/dl). Mean±SD, n=10

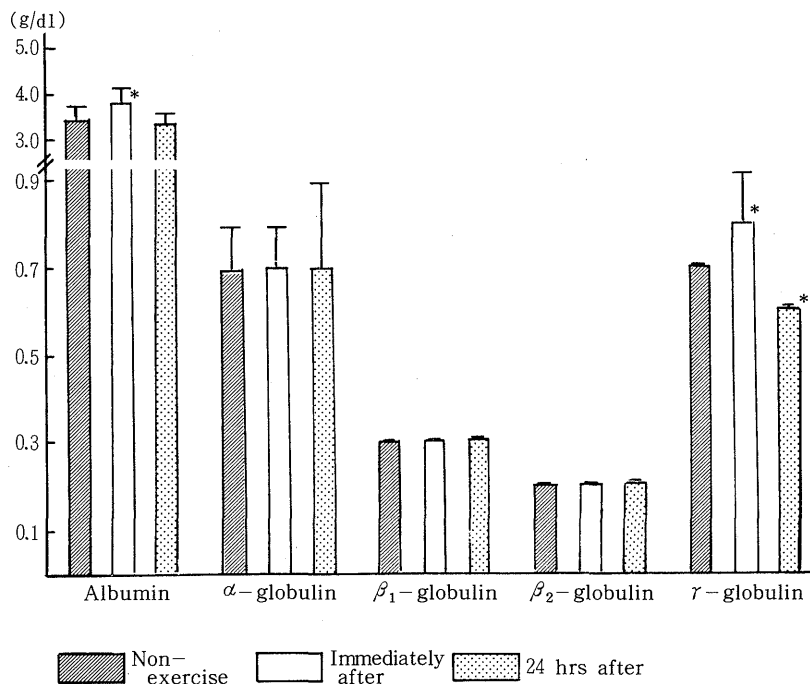


Fig.2. Effects of load exercises on components of Plasma protein by cellulose acetate electrophoresis in rats. The asterisk shows a significant difference from non-exercise ($P < 0.01$). Mean±SD, n=10

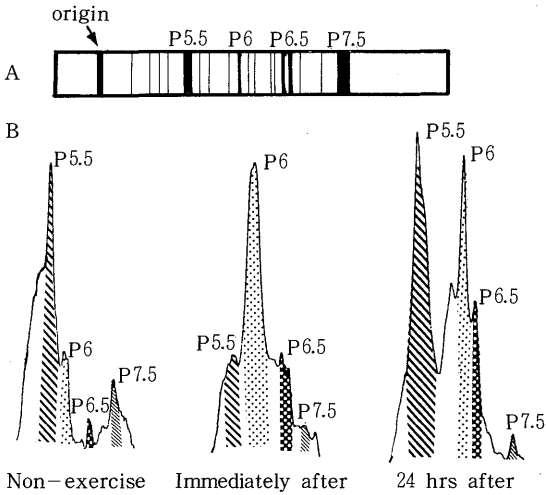


Fig.3. Isoelectric focusing electrophoretic patterns of plasma protein in rats. A : Schematic diagram of isoelectric focusing electrophoretic pattern. B : Densitogram of isoelectric focusing electrophoretic patterns.

図の一例を Fig.4 に示した。各分画はそれぞれの分子量によって、高分子側よりMW200, MW130, MW60, MW27, MW14と仮称した。

運動負荷に伴う血漿タンパク質分画値の変動をみると、Fig.5 に示したように相対濃度では直後群及び24時間群

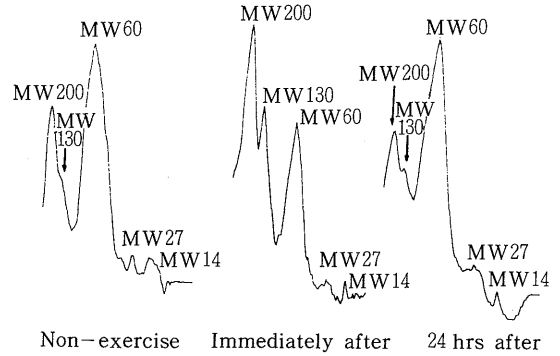


Fig.4. SDS-polyacrylamide gel electrophoretic patterns of plasma protein in rats

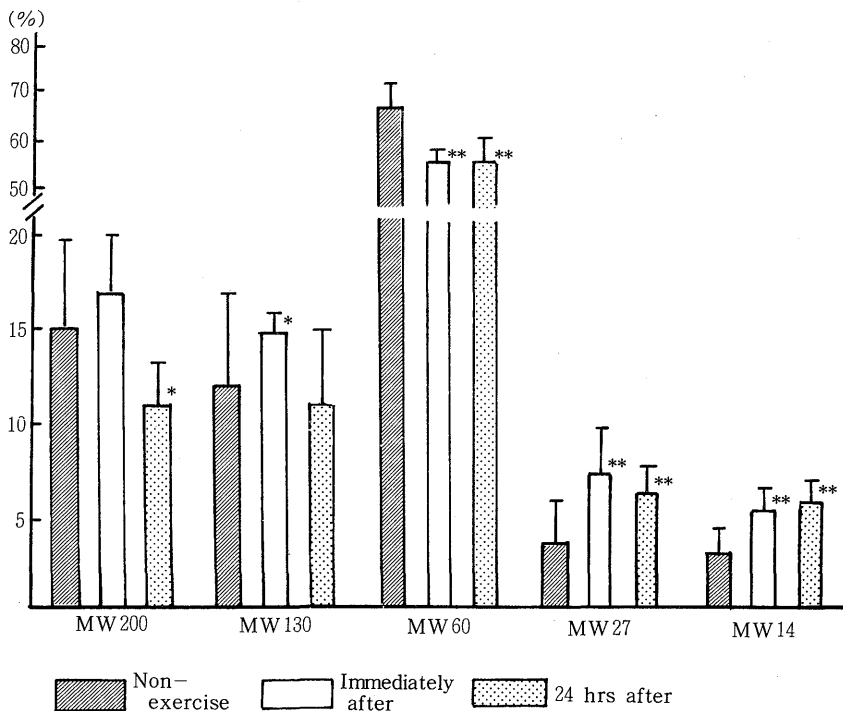


Fig.5. Effects of load exercises on components of plasma protein by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in rats. The asterisk shows a significant difference from non-exercise ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Mean \pm SD, $n = 10$

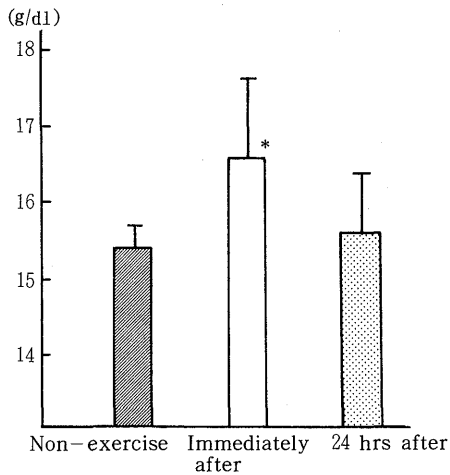


Fig. 6. Effects of load exercises on concentration of hemoglobins in rats. The asterisk shows a significant difference from non-exercise ($P < 0.01$). Mean \pm SD, $n = 10$

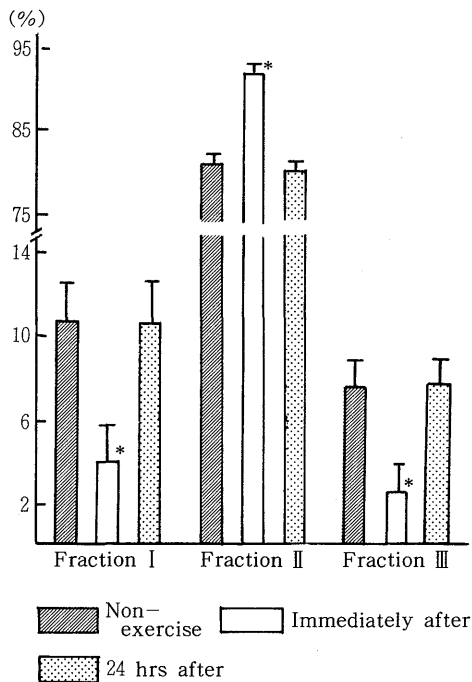


Fig. 7. Effects of load exercises on components of hemoglobin by cellulose acetate electrophoresis in rats. The asterisk shows a significant difference from non-exercise ($P < 0.01$). Mean \pm SD, $n = 10$

ともMW27及びMW14が増加し、MW60が明らかに減少した ($P < 0.01$)。また、MW200は直後群で減少し、MW130が24時間群で増加を示した。

B 運動負荷に伴うHbの変動

1) 血液Hb量

Hb量は Fig.6 に示したように直後群が明らかな増加を示し ($P < 0.01$)、24時間群は対照群とほぼ同様な値であった。

2) Hbの電気泳動法による分画

CA膜法でHbを分画すると、血漿タンパク質分画像の α -globから β -globの位置に3つの band がみられ、これを陽極側から順に分画 I、分画 II、分画 III と仮称した。

これらの成分のうち分画 II は相対濃度においても絶対濃度においても直後群が明らかに増加を示し、分画 I 及び分画 III が減少した (Fig.7)。しかし、24時間群では各分画値ともほぼ対照群と同様な値であった。

IEF法でHbを分画するとpH7.6とpH7.7の位置に鮮明な2本の濃い band がみられ、その前後にそれぞれ2本の細く淡い band が認められた (Fig.8)。これらの成分をそれぞれのpH域によってH-pH7.0、H-pH7.3、H-pH7.6、H-pH7.7、H-pH7.8、H-pH7.9と仮称した。運動負荷が分画値に及ぼす影響はほとんど認められなかった。

SDS法では分子量16,000の位置に最も著明な band がみられ、これをH-MW16と仮称した。また、分子量30,000及び70,000前後の位置にみられる band をそれぞれH-MW30、H-MW70とした。運動負荷による各成分の変動をみると、直後群においてH-MW16が明らかな増加を示し、H-MW70及びH-MW30が減少した。また、24時間群ではH-MW70が増加し、H-MW30及びH-MW16はほぼ対照群と同様な値であった。

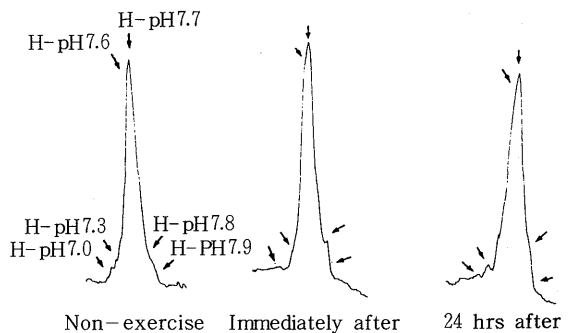


Fig. 8. Isoelectric focusing electrophoretic patterns of hemoglobin in rats.

考 察

A 血漿タンパク質の運動負荷による影響

1) 血漿TP量及び血漿タンパク質のCA膜法による分析
血清TP量は運動によって増加し、その増加は主に血中水分の濃縮によることが知られている⁶⁾。本実験において対照群のTP量は平均5.9 g/dl、直後群は6.4 g/dlで約8.4%の増加がみられ、24時間群では対照群の値に復していた。このTP量の変動はCA膜法による分画値の推移から推測すると、Alb及び $\delta + \gamma$ -globの増加によるものであった。

Albは種々の物質との結合力が強く、ホルモン、遊離脂肪酸、ビタミン、薬物などの輸送に関与することが知られている¹²⁾。したがって直後群で血漿Albが上昇したことは筋の代謝に伴う、代謝産物の輸送に関係があるものと思われる。一方、伊藤^{6, 7)}によると運動によって筋の代謝が亢進すると、組織内の浸透圧が高まり、血液水分が減少して血液濃縮がおこるとともに、肝臓のタンパク代謝機能の亢進がおこることが知られている。このことから考えると本実験におけるTP量の増加は運動による血液濃縮と同時に、肝臓中に貯えられていたタンパク質成分が血流中に放出されたためであろうと考えられる。また、24時間群のAlbが対照群とほぼ同様の値を示したことは、体内代謝が運動負荷前の状態に復したためと推測される。直後群において $\delta + \gamma$ -globが増加したことはCA膜の分画像からみて、 δ 分画、すなわちFibrinogenの増加によるものと思われるが、このことについては更に詳細な検討が必要である。

いずれにしても運動負荷によって血漿のTP量が増加することは明らかであり、血液水分の濃縮及び肝臓よりのAlbの放出が関与しているものと推察される。

2) 血漿タンパク質のIEF法による分析

IEF法は電気泳動の支持体にpH勾配を作成し、各タンパク質の等電点の違いを利用して分画する方法である^{5, 9)}。したがって、血清あるいは血漿タンパク質をこの方法で分画すると、約20~30の成分に分画が可能である^{13, 16)}。しかし、ラットの血漿タンパク質をIEF法で分画した報告はほとんどなされておらず、本実験におけるpH5.5からpH7.5域に分画された18本の分画帯の成分がどのようなタンパク質成分であるかは不明である。しかし、各分画帯の運動負荷による変動をみると、直後群において、pH5.5成分が減少し、pH6.0成分が増加した。また、24時間群では直後群に比べてpH6.0成分及びpH5.5成分が低い値を示して回復傾向がみられた。このpH6.0成

分がどのようなタンパク質成分であるかについては推察の域を脱し得ないが、CA膜法におけるAlbの推移に一致することから、CA膜法におけるAlb分画に含まれる成分、すなわち、Alb、 α -globなどの成分であろうと考えられる。

3) 血漿タンパク質のSDS法による分析

SDS法はポリアクリルアミドゲルの分子篩い効果を利用した電気泳動法であり、血漿タンパク質をその分子量の大きさによって分画することができる^{3, 13, 16)}。本実験においてラットの血漿タンパク質をSDS法で分画すると、分子量60,000前後の成分が主体を占めていた。この成分はその分子量及び分画比から推測すると、おそらくAlbであろうと考えられる。しかし、CA膜法において直後群のAlbが増加したのに対して、SDS法におけるMW60のbandは減少した。したがって、MW60成分はCA膜法におけるAlbとは異なるタンパク質組成であると思われる。

B 運動負荷によるヘモグロビンの変動について

1) Hb量

運動時に末梢血液の赤血球数及びHb量が増加することが知られている¹⁵⁾。しかし、その変化は運動の種類、強度、持続時間などによって一定していない¹⁾。伊藤⁷⁾によると、赤血球数及びHb量は運動が短時間で、しかも激しい場合に著明に増加し、同じ運動時間であれば運動強度が大きいほどその増加量も大きいことが知られている。運動によって赤血球数が増加する原因については、村岡¹⁴⁾がイヌを用いて運動負荷試験を行い、運動とcatecholamineとの関係について報告した。この報告によると、疲労がみられない程度の運動ではadrenalineに変動が起らないが、疲労困憊した状態では安静時の約2~4倍に増加する。また、ヒトの激しい作業では2分以内に著しい血漿noradrenalineの上昇が起こり、その増加は運動量と酸素摂取量に比例すると報告した。catecholamineが血圧を上昇させ、脾臓中に貯えられていた赤血球が血流中に増加することは周知の事実である。しかし、脾臓を摘出したものでも運動によって赤血球数の増加がみられることから、肝臓及び皮下静脈叢の貯溜血球も関与することが知られている⁷⁾。また、猪飼と広田⁸⁾は短時間の運動時には赤血球数が増加するが、この変化は血液から水分が失われ、脾臓、肝臓などの血液貯蔵器官から血球が循環血流中に流れこむことにより、血液が濃縮されるためであろうと述べている。

これらの報告から考えると、本実験における直後群のHb量の増加は運動によって血液貯蔵器官から循環血流中に赤血球が移行したためと考えられる。

2) HbのCA膜法による分画

溶血がみられる血清をCA膜法で分画すると、Hbは血清タンパク質の α_2 -と β -glob分画の間域に分画されることが知られている¹¹⁾。

本実験におけるHbの分画像は α_2 -から β -glob領域に主分画(分画II)がみられ、その陽極側(α_1 -glob位置)及び陰極側(γ -glob領域)に極めてわずかな分画成分がみられた。これらの分画成分はCA膜の分離能及びその分画値から考えると、分画IIがHbであり、分画I及び分画IIIは非Hb赤血球タンパク質であろうと推察される。

総 括

ラットに20分間の遊泳運動を負荷し、血漿タンパク質及び赤血球Hbの変動を電気泳動法(CA膜法, IEF法, SDS法)で検索した。

実験には9週齢のWistar系雄ラットを用い、対照群、運動負荷直後群、運動負荷後24時間群に分けて、それぞれ10例ずつ供試した。

その結果、直後群では血漿TP量及び血液Hb量が増加し、24時間群では対照群に近似した値であった。血漿タンパク質のCA膜法では運動負荷によってAlb及び $\delta + \gamma$ -globが高値を示し、IEF法では相対濃度においてpH6.0成分の増加がみられた。

赤血球Hbは、CA膜法において直後群で分画IIが増加し、分画I及びIIIが減少した。また、SDS法では直後群のHMW16成分が増加した。しかし、IEF法では分画像に明らかな変動がみられなかった。

以上の結果から、20分間の運動負荷直後に血漿TP量及び血液Hb量が増加することが明らかになった。また、この血漿TP量の増加はAlb及び $\delta + \gamma$ -globの増加によるものと考えられた。一方、血液Hb量の運動負荷直後の増加はSDS法におけるMW16成分の増加によるものと考えられた。しかし、SDS法の分画値には非Hb赤血球タンパク質成分も関係するものと考えられ、更に詳細な検討が必要である。

参 考 文 献

1) 阿久津邦男: スポーツと血液および循環機能・体育の科学, 11 442-446 (1961)
 2) Brigita, S., Erhardt, G. and Senft, B.: Procedure for

simultaneous phenotyping of geuetic variants in cows milk by isoelectric focusing. *Animal Blood Groups and Biochemical Genetics.*, 16 183-191 (1985)
 3) 福田守道・新津洋司郎: 等電点分画法. 臨床病理, 特30 91-108 (1977)
 4) 林 建志・大場義樹: SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法. 蛋白質核酸酵素, 17 304-311 (1972)
 5) Franklin, H. B. and James, W. D.: The separation of partially oxidized hemoglobins. *Biochim. Biophys. Acta*, 229 51-57 (1970)
 6) 伊藤 郎: 運動と血液化学研究法. 体育の科学, 26 607-611 (1976)
 7) 伊藤 郎: 身体運動と血液性状. 体育の科学, 26 547-552 (1976)
 8) 猪飼道夫・広田公一: 運動と血液——内部循環の維持——. スポーツ科学講座3 運動の生理, 大修館書店. 東京. (1967) PP.195-207
 9) Koepuke, J. A., Thoma, J. S. and Schmidt, R. M.: Identification of human hemoglobins by use of isoelectric focusing in gel. *Clin. Chem.*, 21 1953-1955 (1975)
 10) 弘 卓三・堀居 昭: 身体トレーニングに伴う赤血球分布曲線の研究. 体力科学, 31 279-290 (1984)
 11) 河合 忠: 血漿タンパク分画. 臨床病理, 特12 1-13 (1971)
 12) 河合 忠: 血漿タンパクの種類と性状. 血漿タンパク, 医学書院, 東京, (1974) PP.127-191
 13) 間根山幸子・宝来 聡・尾本恵市: 薄層ポリアクリルアミドゲル等電点分画による赤血球PGM₁の亜型. 生物物理化学, 22 49 (1979)
 14) 村岡 功: 運動とカテコールアミン. 体育の科学, 24 831-836 (1978)
 15) 大平充宣・芝山秀太郎・江橋 博: 運動による血液組成および鉄代謝の変動. 体力研究, 59 40-49 (1985)
 16) 大島美奈子・井上徳治・原 三郎: 薄層PAG等電点分画法による血液(ヘモグロビン)の種族鑑定, 生物物理化学, 26 71-78 (1982)
 17) 七條喜一郎・成瀬満佐子・竹内 崇・鈴木 實・斎藤俊之: ラットの血液及び筋肉組成に及ぼす運動負荷の影響. 鳥大農研報, 43 223-229 (1990)