

原 著

細胞電気泳動に関する研究

—赤血球の大きさ, メジウムの粘度・誘電率の影響と表面電位
および電荷密度の計算—

小 野 隆 彦 戸 塚 忠 政
草 間 昌 三 田 中 貴

信州大学医学部第一内科学教室

STUDIES ON CELLELECTROPHORESIS

—INFLUENCE OF RED BLOOD CELL SIZE, VISCOSITY AND DIELECTRIC
CONSTANT OF MEDIUM, ON ZETA (ζ)-POTENTIAL AND SURFACE
CHARGE DENSITY—

Takahiko ONO Tadamasu TOZUKA,
Shozo KUSAMA, Takashi TANAKA,

Department of Internal Medicine, Faculty of Medicine,
Shinshu University

Key words: 誘電率 (dielectric constant), 表面電位 (ζ -potential), 表面電荷密度 (surface charge density)

緒 言

細胞電気泳動は、近年になり日本においてもしだいに
行なわれるようになったが、その方法や泳動装置・
メジウムには統一された基準がなく、研究者により数
値はまちまちである。また、リンパ球や癌細胞など、
いろいろな細胞について泳動されているが、その結果
は易動度にて示され、日本では表面電位や電荷密度で
表示されたものはみられない。易動度のかわりに表面
荷電の電位や電荷密度で表現したら、より一般的な値
として表現される可能性が予想される。Pollack等¹⁾
は1965年に高分子化合物の誘電率を測定し、それらの
赤血球凝集反応に対する影響を解明した。著者も表面
電位計算には誘電率が必要なため誘電率に興味をも
ち、高分子化合物の水溶液の誘電率の変化を追求し
た。さらに赤血球の大きさと易動度の関係は理論的
にも実験的にも結論が出されているが、実験的には赤
血球の大きさを写真で示すというような報告はみられ
ない。赤血球を多数泳動すると、易動度のヒストグラム

は正規分布をすることが知られているが、たんに誤差
だけでなく、赤血球の大きさにも関係があるかどうか
実験的に追求した。

実験方法

メジウムの粘度の測定は Ostwald 型粘度計を用い
た。誘電率の測定は、卓上型誘電率計 (電気化学計器
株式会社製) と Delica ミニブリッジ (三田無線研究
所製の直列抵抗ブリッジ) を用いた一部自作の装置と
で行なった。赤血球の電気泳動は Zeiss の Cyto-
pherometer に自動撮影装置をつけたものを用いた。
電荷の計算は、表面電位 (ζ 電位) の計算には、
Smoluchowski の $U = \frac{D\zeta}{4\pi\eta}$ を用い、電荷密度の計
算には Abramson らの式を用いた。

1. 誘電率の測定

卓上型誘電率計は、構造は明らかでないが、500キ
ロヘルツ (500×10^3 サイクル毎秒, 500KHz) の周波
数にて電極の電気容量 (キャパシタンス) の変化を、
空気中と液中で比較できるようになっており、その値

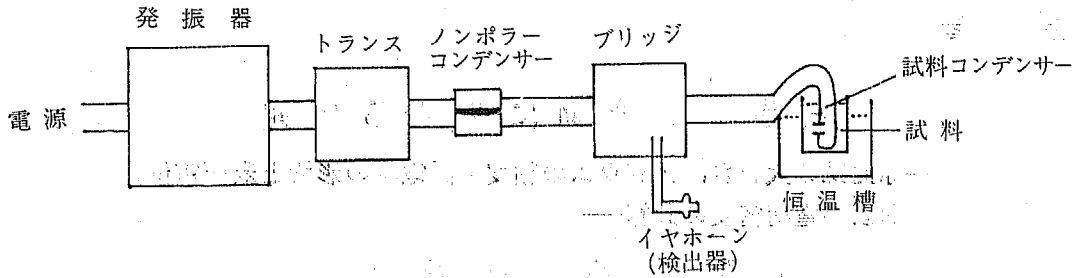


図 1 Delica ミニブリッジ使用誘電率計

がメーターより直読できるようになっているが、液体の電導度の上限は約 $100\mu\Omega$ までである。直列抵抗ブリッジを用いた一部自作の誘電率測定装置は、図1の如く、シンクレータ(発振器 NF 社製)に、平衡回路にするためのトランスと、ブリッジおよびバリコンを改造した試料コンデンサーから成っている。測定周波数は500Hz, 1KHz, 10KHz, 20KHz の4種または一部を用いた。この場合には誘電率は直読できず、試料コンデンサーのキャパシタンス値から誘電率の変化を推定した。溶液の電導度がキャパシタンス測定に大きく影響するので、純水に 1/50N の KCl 水溶液を滴下し、試料と同じ電導度をもつように調製した KCl 溶液と、試料のキャパシタンスとを比較し、次式をもって容量の変化比とした。

$$\Delta C (\text{容量の変化比}) = \frac{\text{試料容量} - \text{同電導度 KCl 溶液の容量}}{\text{同電導度の KCl 溶液の容量}}$$

2. 細胞電気泳動測定

赤血球は健康な同一人のO型を用い、5% EDTA・2Na 水溶液にて凝固を防ぎながら、肘静脈より採血し、生理食塩水とメジウムで各1回洗って泳動した。メジウムは緩衝液として Furchgott らの Standard saline-phosphate solution (以下 S. S. とする)を用い、イオン強度は0.043, 泳動温度は $22.0 \pm 0.5^\circ\text{C}$, pH7.2で共通である。泳動を撮影後、フィルムを4倍以上に引きのばし焼き付けて、易動度と赤血球の大きさを計測した。赤血球塊を作るため、健康人のA型赤血球に、O型血清を生理食塩水にて32倍に稀釈したものを、血球量1に稀釈血清4の比で加え、凝集させてからメジウムにて1回洗って泳動した。

3. 電荷計算

ζ 電位は η を粘度, U を易動度, D を誘電率として $\zeta = \frac{4\pi\eta U}{D}$ で表わされる Smoluchowski の式を用い

たが、この式は ζ も U も静電単位系であることが必要なので、著者は ζ を実用単位系にするため書きかえて、 π を 3.14 として $\zeta (\text{mV}) = \frac{1.1304 \times 10^3 \times \eta U}{D}$ なる式を得た。この式では U は易動度で $\mu\text{sec/V/cm}$ で、 η は centipoise として表わされる。電荷密度の計算は Abramson らの式 $\sigma (\text{e. s. u./cm}^2) = \sqrt{\frac{NDKT}{2000\pi}}$ を用いた。この式では N はアボガドロ数 (6.025×10^{23}), D は誘電率, K はボルツマン定数 ($1.380 \times 10^{-16} \text{erg, deg}^{-1}$), T は絶対温度, C はイオン濃度, Z はイオン価数, e は電子の電荷 ($4.802 \times 10^{-10} \text{e. s. u.}$), e は自然対数底 (2.718...) であり、 ζ はふたたびミリボルトから静電単位 (e. s. u.) に書きかえて代入した。イオン濃度は、メジウム中の S. S. の Na^+ , Cl^- , K^+ , H_2PO_4^- , HPO_4^- , それぞれの電離度を 100% とみなして計算した。指数関数部は高等函数表²⁾を利用した。

結 果

1. 誘電率の測定

A. 直列抵抗ブリッジを用いた場合

(1) 精度の検査

空気中のコンデンサーの容量は 500Hz で 215pF (ピコファラッド), 1KHz で 210pF, 10KHz で 210pF, 20KHz で 210pF と周波数に関係なく一定した。エチルエーテルは誘電率の基準物質であるが、特級エチルエーテルの 19°C でのコンデンサーの容量は、1KHz で 1000pF, 10KHz で 1000pF を示した。これより誘電率を求めると、 $\frac{\text{エーテル中の容量}}{\text{空気中の容量}} = \frac{1000}{210} = 4.76\dots$ となり、化学便覧による値は 20°C にて 4.335 ± 0.005 であるから、誘電率で 0.3, 約 7% の誤差があった。純水中では 1KHz で $0.12\mu\text{F}$, 10KHz で $0.21\mu\text{F}$ であり、 $\frac{\text{水中の容量}}{\text{空気中の容量}}$ は 1KHz で 5.71×10^2 , 10KHz で

1.0×10²である。次に特級のグリシンの1モル水溶液(22°C, 比電導度 13μσ)にて容量を測定するとミニブリッジのDダイヤルが電導度によるみかけの容量増加を補正する必要を示した。これは直列抵抗型ブリッジであることによるもので、電導度を0にした状態に換算するものではない。補正後の値は、グリシンが1KHzで1.0μF, 10KHzで1.2μFとなり、13μσの水はそれぞれ0.9μFと0.85μFとなった。これよりΔCを計算すると1KHzでは $\Delta C = \frac{1.0 - 0.9}{0.9} = \frac{0.1}{0.9}$, 10KHzでは $\Delta C = \frac{1.2 - 0.85}{0.85} = \frac{0.35}{0.85}$ となる。ΔCは厳密には誘電上昇率ではないが、水の誘電率を基にした誘電率の変化とみなした。このΔCを水の誘電率を80とみてかけると、 $80 \times \frac{0.1}{0.9} = 8.9$, $80 \times \frac{0.35}{0.85} = 32.9$ となり、したがってグリシン1モル水溶液の誘電率としては、1KHzの測定で80+8.9=88.9, 10KHzで80+32.9=112.9となった。Pollackの引用するアメリカの標準値では、グリシンの1モル溶液で23.5±0.4上昇するとしており、この時、水は78.54なので全体として78.54+23.5=102.04であるというので、著者の得た値88.9, 112.9はかなり食い違いがあるが、誘電率は測定周波数に左右されるので、一がいに不正確とは断定出来ない。しかし、一般的には、電導度のある

物質を測定する場合は直列抵抗ブリッジより、並列抵抗ブリッジの方が正確であるので、ある程度の誤差は含まれると考えられる。高分子化合物は不純物として電解質が必ず共存する一方、周波数が高くては高分子の誘電率が出ないので、500KHzの卓上型誘電率計と共に同一物質について、このブリッジを用いて測定してみた。

(2) Ficoll の測定

平均分子量(40,000)のFicoll(Pharmacia, Sweden)を5%(W/V), 2.5%, 1.25%について測定すると表1の如くになった。5%溶液では等電導度のKCl水溶液に対し、15.5~18.9%の容量増加があり、2.5%では45.0%の容量増加がみられたが、1.25%では逆に10.5~5.3%の減少となった。濃度により上昇率が異なり、また、低濃度で逆転するのは、装置の感度が悪いためと思われる。

(3) P. V. P. の測定

K=90のPolyvinyl pyrrolidone(関東化学)の2.5%, 1.25%水溶液について測定した結果は、表2の如くになった。2.5%では22.3~47.8%の容量増加となり、1.25%では13.7~48.7%の増加となった。この結果では、周波数の低い方に容量増加が強くて出ている。

表 1 Ficoll の 容 量 変 化 (21°C)

周波数	5% 26μσ			2.5% 20μσ			1.25% 6μσ		
	容 量 の 変 化			容 量 の 変 化			容 量 の 変 化		
	Ficoll	水	ΔC%	Ficoll	水	ΔC%	Ficoll	水	ΔC%
500Hz	2.400 μF			2.090 μF			0.657 μF		
1K	2.140			1.920			0.679		
10K	2.055	1.779 μF	+15.5%	1.870	1.290 μF	+45.0%	0.643	0.718 μF	-10.5%
20K	2.080	1.750	+18.9	1.870	1.290	+45.0	0.643	0.679	-5.3

表 2 P. V. P. の 容 量 変 化 (21°C)

周波数	2.5% 10μσ			1.25% 6μσ		
	容 量 の 変 化			容 量 の 変 化		
	P. V. P.	水	ΔC%	P. V. P.	水	ΔC%
500Hz	1.153 μE	0.819 μF	+47.8%	0.690 μF	0.464 μF	+48.7%
1K	1.039	0.797	+30.4	0.690	0.500	+38.0
10K	1.002	0.819	+22.3	0.548	0.482	+13.7
20K	1.012	0.819	+23.6	0.577	0.493	+17.0

表 3 低分子 Dextran の容量の変化 (22°C)

	5% 38μC			2.5% 25μC		
	容量の変化			容量の変化		
周波数	Dextran	水	ΔC%	Dextran	水	ΔC%
500Hz	2.307 μF	2.155 μF	+7.1%	1.385 μF	1.442 μF	-4.0%
1K	2.307	2.078	+11.0	1.347	1.383	-2.6
10K	2.230	2.058	+8.4	1.347	1.383	-2.6
20K	2.250	2.038	+10.4	1.308	1.442	-9.3

(4) Dextran の測定

低分子 Dextran (分子量 40,000, 日研化学) を測定した結果は表 3 の如くになった。5% では周波数によって異なり、8.4-11.0% の容量増加となったが、2.5% では逆にすべて容量は減少した。くり返して測定してみたが、やはりわずかな容量増加か、わずかな容量の減少であった。高分子 Dextran (分子量 240,000 半井化学) の 2.5% 溶液では表 4 の如く、0.4-11.6% の容量増加を認めた。

表 4 高分子 Dextran の容量の変化 (22°C)

	2.5% 242μC		
	容量の変化		
周波数	Dextran	水	ΔC%
500Hz	10.400 μF	9.980 μF	+4.2%
1K	10.020	9.980	+0.4
10K	11.680	10.560	+10.6
20K	12.320	11.040	+11.6

表 5 蔗糖の容量の変化 (22°C)

	5% 6.8μC			2.5% 3μC		
	容量の変化			容量の変化		
周波数	蔗糖	水	ΔC%	蔗糖	水	ΔC%
500Hz	0.634 μE			0.376 μF		
1K	0.634	0.611 μF	+3.8%	0.376	0.352 μF	+6.8%
10K	0.634	0.587	+8.0	0.376	0.352	+6.8
20K	0.634			0.376		

(5) Saccharose の測定

1 級の Saccharose (関東化学) の 5%, 2.5% の水溶液について測定すると、表 5 の如くになった。5% で 3.8-8.0% の容量増加を、2.5% で 6.8% の容量増加を認めた。

(6) Glucose の測定

5.4% の Glucose (第一製薬) を測定した結果は表 6 に示す如くとなった。1KHz と 10KHz しか測定しなかったが、10KHz で 11.1% の容量増加をみた。

以上、Ficoll の 1.25% 溶液、低分子 Dextran の 2.5% 溶液をのぞき、ほとんどの物質の溶液で容量増加がみられたが、この容量増加から誘電率を算出するのは困難である。というのは、純水にしても $E = E_{\infty} + \frac{E_0 - E_{\infty}}{1 + (JWZ)^2}$ の式³⁾ に表わされる周波数の影響と誘電損失の問題および粘性を考慮した 0% 濃度への

表 6 ブドウ糖の容量の変化 (21°C)

	5.4% 5μC		
	容量の変化		
周波数	ブドウ糖	水	ΔC%
1KHz	0.500 μF	0.500 μF	0%
10K	0.600	0.540	+11.1

外挿法による推定等の問題点があるからで、たんに水溶液中の容量や水溶液中の容量の計算だけでは空気中の容量水中の容量がないからである。また、容量の増加と減少が同一の物質で認めたということは、やはり精度が悪いといえるからである。

B. 500KHz の卓上型誘電率計を用いた場合

(1) 精度の検査

エテルエーテルを測定すると19°Cにて誘電率は直読されて5.1であった。純水は22°Cで80.5を示した。グリシンの1モル溶液は、そのままでは電導度高く測定出来ないので、2倍に稀釈して測定すると22°Cで93となった。水の誘電率を約80とみると、誘電率上昇は93-80=13で、13×2=26は1モルで26上昇すると推定された。これは標準値にかなり近い値である。エーテルにせよ、グリシンにしても、標準値とはやり若干のずれがあり、周波数と測定器による誤差がどうしてもさげられないのであろう。以下電導度の低い濃度で誘電率を測定した結果は表7の如くである。

表7 500KHzの誘電率計での測定

	濃度	温度	誘電率
Ficoll	2.5%	20.5°C	80.5
P. V. P.	2.5%	20.5°C	81.5
Dextran 低分子	2.5%	20.5°C	80.5
高分子	2.5%	20.5°C	80.5
Dextran 高分子	5% ³⁰	22.5°C	78.0
+5.4%ブドウ糖	45		
+水	25		
蔗糖	5%	22°C	80.0
3%ブドウ糖	75	22°C	80.0
+水	25		
10%ブドウ糖	75	22°C	79.5
+水	25		
ブドウ糖	5.4%	21°C	80.0

(2) Ficoll の測定

2.5% Ficoll は20.5°Cで80.5であった。

(3) P. V. P. の測定

2.5%のP. V. P. は20.5°Cで81.5であり、わずかに水の誘電率よりわずかに高値を示した。

(4) Dextran の測定

低分子 Dextran は2.5%で20.5°Cにて80.5と水と全く変化を示さず、高分子 Dextran は2.5%で80.5であった。さらに高分子 Dextran (平均分子量228,000 半井化学) の5%溶液30+5.4%ブドウ糖45+水25の全体の誘電率は78であった。水の誘電率より低いのは、周波数が高いことによると考えられる。

(5) Saccharose の測定

5%溶液で22°Cにて80.0であった。水より1.0低値を示した。

(6) glucose の測定

5.4%ブドウ糖溶液は21°Cにて80.0であった。

泳動メジウムに用いたブドウ糖濃度での各誘電率は、22°Cで3%ブドウ糖溶液75+水25では80.0であった。10%溶液75+水25では79.5であった。なお、水25は、S. S. の量にかわるものである。

以上各種溶液を2つの方法で誘電率の変化をみようとしたが、それぞれの方法に問題点があるので、細胞電気泳動はブドウ糖溶液と、高分子 Dextran (平均分子量228,000) のみを使用し泳動した。

2. 粘度の測定

22°Cにて3%ブドウ糖溶液75容に standard saline-phosphate solution 25の混合液は、1.0039 cp (centipoise) であった。5.4%ブドウ糖溶液75容に S. S. 25容の混合では1.0681cpであり、10%ブドウ糖溶液75容に S. S. 25容を加えた液では1.1562cpであった。高分子 Dextran (分子量228,000) の5%溶液30容に、5.4%ブドウ糖45容、S. S. 25容加えたメジウムでは1.7616cpであった。

3. 易動度と赤血球の大きさおよび粘度

図2, 3, 4, 5はそれぞれのメジウム中での赤血球の泳動結果である。3%ブドウ糖とS. S. のメジウムでは、生理的に低浸透圧であるが、泳動写真上の赤血球の直径の平均値は8.0μである。易動度の平均値は1.470±0.049μ/sec/V/cmである。低浸透圧にもかかわらず、赤血球はあまり大きくなり、また大きさと易動度の関係は一定でない。図3は5.4%ブドウ糖を用いたメジウムの泳動で、赤血球直径の平均は8.2μで、易動度の平均は1.459±0.029であった。これも個々の赤血球の大きさと易動度には関係なく、また3%ブドウ糖液の場合と比較すれば、やゝ易動度が低い

易動度 1.470±0.049
φ 8.0μ
ξ 20.84mV
電荷密度 3142.1e. s. u.

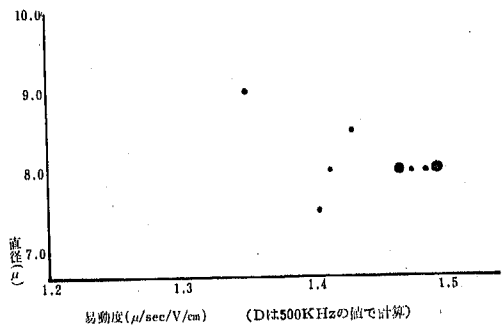


図2 3% G75+S. S. 25

易動度 1.459±0.029
 ϕ 8.2 μ
 ζ 22.01mV
 電荷密度 3330.3e. s. u.

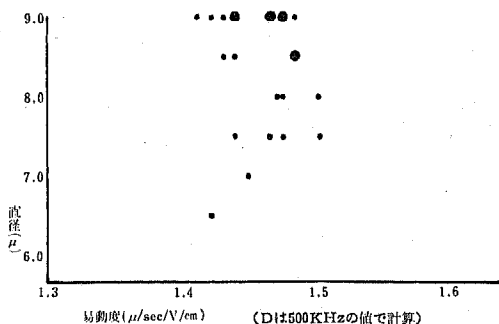


図 3 5.4% G75+S.S. 25

易動度 1.199±0.071
 ϕ 8.2 μ
 ζ 30.60mV
 電荷密度 4774.7e. s. u.

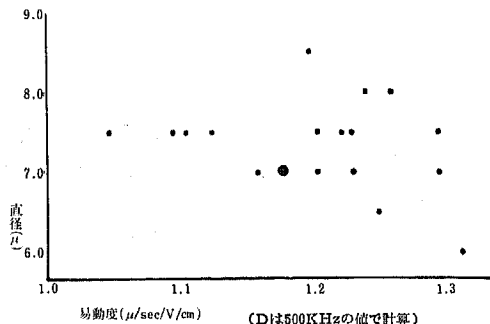


図 5 5% Dex. 6+5.4%G9+S.S. 25

易動度 1.389±0.070
 ϕ 8.2 μ
 ζ 22.83mV
 電荷密度 3460.4e. s. u.

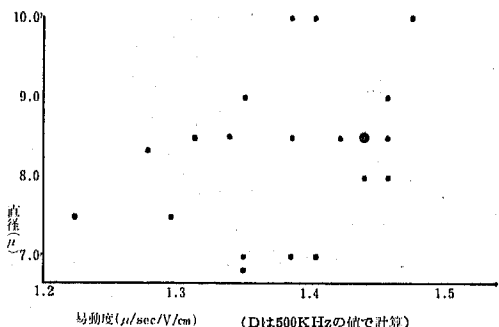


図 4 10% G75+S.S. 25

が、粘度を考慮すると、3%は1.4757で $U \times \eta$ はかえって、5.4%液を用いた方が1.5584で大となった。図4は10%ブドウ糖溶液を用いた生理的に高張なメジウム中での泳動であるが、赤血球は小さくならず、直径の平均は8.2 μ であり、易動度の平均は1.389±0.070である。これに粘度1.6060をかけると、5.4%液を用いた時よりわずか大きくなった。図5は高分子Dextranを含むメジウム中での泳動で、このメジウムは低浸透圧であるが、赤血球は大きくならず、直径の平均値は8.2 μ であり、易動度の平均値は1.199±0.071である。 $U \times \eta$ は5.4%ブドウ糖液より大きく、2.1122と最大となった。赤血球の個々の大きさと易動度の間に何の関係もないことと、Dextranを用いたメジウムでは、粘度を考慮するとブドウ糖中の易動度

より大きいと云える。

次に赤血球に凝集素を作用させ、赤血球の凝集塊を作って泳動した結果が表8である。この時のメジウムは5.4%ブドウ糖とS.S.を合せたものであり、赤血球に抗体を合せた同一試料を泳動し、その泳動中に単一の赤血球の易動度と、凝集塊の易動度とを比較したものである。易動度の平均値は、凝集塊は1.341±0.062であり、単一の赤血球は1.433±0.044であって、全体の平均値は1.397であった。凝集塊の方が易動度が低く、推計学的にも $Pr\{F > 12.73\} < 1\%$ で有意差あり、 $\sigma_1 = \sigma_2$ は5%以上となり否定出来ない。大きな凝集塊は易動度が低いと云える。

表 8 凝集赤血球易動度 ($\mu/sec/V/cm$)

凝 集 塊	1.341±0.062
単 一 赤 血 球	1.433±0.044
全 赤 血 球	1.397±0.068

4. 電荷計算

前述の ζ (mV) = $\frac{1.130 \times 10^3 \times \eta U}{D}$ に誘電率として卓上型誘電率計の値をそのまま入れ、さらに、電荷密度 σ を計算すると、3%ブドウ糖を用いたメジウムでは、 ζ は20.84mVとなり、 σ は3142.1e. s. u./ cm^2 となった。

5.4%ブドウ糖を用いたメジウムでは、 ζ は22.01mV、 σ は3330.3e. s. u./ cm^2 となった。10%ブドウ糖を用いたメジウムでは、 ζ は22.83mV、 σ は3460.4e. s. u./ cm^2 となった。さらに、高分子Dextranの入ったメジウムでは、Dを78として、 ζ は30.60mV、 σ は

4774.7e. s. u./cm²となった。これからみると易動度遅い程は高く、 σ も高いという傾向である。計算式からみると、これらの4種のメジウムは、イオン濃度がほぼ等しいので、そんなに σ が変化することは考えられず、従ってDの値が正しくないように考えられる。そこで、直列抵抗ブリッジを用いて容量増加をしらべた時の値を誘電率の上昇とみなして、ブドウ糖の場合の+11.1%を濃度に比例する値として、ブドウ糖溶液1%は2.06%の誘電率上昇を起すとして計算してみた。

3%ブドウ糖75容を用いた時は、メジウムのブドウ糖濃度は $\frac{3 \times 75}{100} = 2.25\%$ であるので、 $2.25 \times 2.06 = 4.64$ (%)の誘電率の上昇とすると、純水のDを80とみて、 $80 \times 1.0464 = 83.712$ が3%ブドウ糖を用いたメジウムの誘電率として計算してみた。すると σ は19.92mVとなる。5.4%ブドウ糖を用いたメジウムでは、同様にして20.32mVとなり、さらに10%ブドウ糖を用いたメジウムでは19.65mVとなる。以下これ等の値と、新しいD値として83.71, 86.67, 92.36を用いて σ を計算すると、3%ブドウ糖のメジウムの時3058.7e. s. u./cm²、5.4%ブドウ糖の時3000.9e. s. u./cm²、10%ブドウ糖の3163.8e. s. u./cm²となった。この計算結果では全体にメジウムによる変動が小さくなることわかる。つぎに、高分子Dextranの場合も、泳動メジウムとは分子量が240,000と228,000でずれがあるが、直列抵抗ブリッジで240,000について得た容量増加が(2.5%溶液で+11.6%)を泳動メジウムに代用して誘電率の変化として計算した。5% Dextran 30容、5.4%ブドウ糖45容、S.S. 25容のメジウムでは、デキストランの濃度は 5×0.3 すなわち1.5%であり、ブドウ糖の濃度は 5.4×0.45 、すなわち2.43%である。Dextranによる誘電上昇は $80(1+0.015 \times 11.6) = 80 \times 1.174 = 93.92$ で、ブドウ糖による誘電上昇は $80(1+0.0243 \times 2.06) = 80 \times 1.050 = 84.0$ となる。これらが互に干渉することなく上昇させたとして、全体として97.92の誘電率となり、これにより σ を計算すると σ は24.37(mV)となり、 η は4125.1 e. s. u./cm²となった。全体として η もブドウ糖液の場合に近くなったが、Dextranの場合のみかなり高い。

これはDの値の想定が真の値とずれが大きいのか、高分子Dextranの不純電解質の影響のためと考えられる。また、以上4つのメジウムでの泳動結果では、メジウムの誘電率が変化していると考えた方が、 σ お

よび η の差異が小となることがわかった。

考 按

細胞電気泳動の易動度の正確さをチェックするため、標準物体の易動度を基にするという考えは以前よりあり、一応、石英粒子が良いとされているが、最近迄は発売されていなかったで、まだ広くは使われていない。著者はこの実験において、易動度よりも安定した値を示すと予想した電位と電荷密度を、特にメジウムとの関係で追求したのであるが、やはり予想通り、誘電率が大きく変化すると仮定すると、かなり各メジウムでの泳動結果が近い値を示すようになった。しかし、電位を計算するには、一番の難関は誘電率の測定であり、低分子の物質や、固体や、電導度のない物質については数多くの測定がなされているにもかかわらず、高分子化合物や高い電導度をもつ水溶液中の物質についての報告が少ないため、やはり電位計算は困難といわざるをえない。誘電率の測定原理や方法は、高島士郎⁴⁾や下沢隆⁵⁾の著書にのってはいるが、誰もがすぐ測定できるものではないことを示している。一方、市販の測定器も少なく、電子機器のメーカーに依頼して作ってもらうのが日本の現状である。マイクロユーブを用いる測定法は別として、一般に電気振動を用いて誘電率を測定するには、LC回路において電気振動周波数 f は、 $f = \frac{1}{2\pi\sqrt{LC}}$ で表わされる振動が強く起こることが利用されることが多い。 f はコイルのインダクタンスと、コンデンサーのキャパシタンス C によって決まるので、試料を含むコンデンサーの C の変化を、周波数の変化としてとらえるか、またはインピーダンスの変化としてとらえればよいのである。市販の誘電率計は、エーテルやグリシンには比較的正しい値を示したが、ブドウ糖やDextranの水溶液では正しい値を示さなかった。その原因は周波数にあると考えられる。これはDebyeの理論が示す如く、高分子は周波数が高くなると分極が減少し、双極子の動きが停止するからである。Pollack⁶⁾は、発振器やブリッジや検出器など各会社の製品を集めて測定回路を作り、Dextran, P. V. P., Ficoll, 牛アルブミン等の誘電率を測定した。 ΔD 1%値を高分子溶液の誘電率の標準値として提唱している。

ΔD 1%値とは、その物質が1%の濃度につき、どれほど誘電率の変化を起すかという値であり、 $\Delta D = \frac{C_p - C_w}{C_0}$ で表わされる。 C_p は未知溶液のParallel-

capacitance, C_w は未知溶液と同じ電導度をもつ食塩水溶液の parallel capacitance で, C_0 は容器に空気が入っている時の capacitance としている。parallel-capacitance の意味がはっきりしないが, 多分純水の誘電率に対する比較が含まれているようにとれる。周波数を100KHzに固定して測定しているのも問題のあるところで, $\Delta D1\%$ を臨床用 Dextran で約40, P.V.P. で約36, Ficoll で15, 牛アルブミンで6としているが, 周波数を下げれば, また異なる値が出るものと思われる。著者の用いた卓上型誘電率計は500KHzで, Dextran には誘電率の上昇は認められなかったのであるが, 100KHzと500KHzで, そう大きな差異が出るものであろうか。また, 電気容量の測定には, 損失電流の問題もあるので, 正確な誘電率は簡単に測定出来るものではなく, 著者の直列抵抗ブリッジでの容量の測定は, 500KHzの誘電率計に対し, 低周波での容量の変化を認めるかどうかの実験に終わった。しかし正確な誘電率の値が出なくても, ζ 電位や電荷密度からみて, ブドウ糖や Dextran も誘電体としてみた方が細胞電気泳動結果からの電位計算において, より理論値に近くなるという結果が出ただけでも収穫であった。 ζ 電位計算式および電荷密度計算式をみると同じ細胞で同じイオン強度であれば, 誘電率や粘度が変わっても一定の電位と電荷密度になるはずである。但し, この場合イオンが細胞内に入る可能性があり, その場合は Haydon⁸⁾の式 $\sigma = (1 + \sqrt{1 - \alpha}) \sqrt{\frac{2DnKT}{\pi}}$ - $\frac{24_0}{2KT}$ のイオンの透過性に関係する $\sqrt{1 - \alpha}$ の項がつくが, 問題が複雑になるので, イオンの透過性は無視することにする。ブドウ糖の各濃度における計算結果は比較の数値が近くなることで, このことは正しいと考えられるが, Dextran の場合は誘電率が正しくないのか, かなりブドウ糖の場合より高い値が出た。Dextran は臨床的にも Plasma expander として使われ, 硫酸塩は経口的血栓形成予防剤としても使われている。Wehinger⁶⁾によると, 低分子 Dextran 静注によりトロンボエラストグラムにて r 時間の延長と ma 巾の減少が起き, 血餅収縮は障害されたといひ, また, Ross⁷⁾は Dextran の入ったメジウムでの血小板泳動は, 人血清中の泳動より血小板等電点が下り, ヘパリンが最も等電点を下げることを見ている。Ross は Dextran と血小板表面の蛋白との結合の可能性を認めて, 血小板凝集抑制作用の原因と考えたが, 血小板凝集の第一段階には ζ 電位が関与するという見方もある。つまり血小板の等電点が Dextran に

より下がれば, 血液の pH 正常値からのへだたりが大きくなり, ζ 電位が増すであろう。 ζ が高くなれば, その電気的な反発力で血小板もくっつきにくくなるという見方である。しかし, 血小板と Dextran が結合するのではなく, 単に Dextran が誘電体として作用するだけであるとすると, また別の解釈が考えられる。すなわち, ζ 電位の計算式からは, $\zeta = \frac{4\pi\eta U}{D}$ にみる如く, 誘電率 D は, 大きくなれば ζ を下げるように働かずであり, η は大となっても U は小さくなり, 全体として ζ が大きくなることは考えにくい。しかし, この場合, 個々の血小板の表面において電位が下ったとしても, 各血小板の間もやはり誘電体によってへだてられ, 血小板と血小板の間に絶縁体が介在し, 血小板の凝集を電気的にも, また粘性によっても抑制するという見方もできる。赤血球の凝集に対する高分子の影響はまた別のようで, P.V.P. も以前臨床的に使われたことがあるが, 当時 P.V.P. により赤血球が凝集しやすくなることが知られ, P.V.P. と赤血球の総合態度が Hummel⁹⁾により研究された。それによると P.V.P. は赤血球と比較的疎に結合するという事であるので, この場合の赤血球凝集には, P.V.P. の誘電率の上昇による赤血球の ζ 電位の低下が関与する可能性が強い。Pollack^等¹⁰⁾も赤血球の Rh 因子による凝集反応が, 高分子をメジウムに入れることによって促進されることをみて, その原因をメジウムの誘電率上昇による赤血球の ζ 電位の低下のためと結論していることは正しいと考えられる。ここで問題となるのは, 血小板の場合と赤血球の場合で逆の現象が起きることであろう。血小板は凝集しがたくなり, 赤血球は凝集しやすくなるのはなぜか。著者は, これについては, 血小板は赤血球より小さく, 又軽いので電気的力に対し, イオンと同じように誘電体の作用を受け易いのではないかという見方と, もう一つは, Dextran が構造上ブドウ糖やヘパリンに似ているので, 血小板膜に対し, 特別に保護作用があるのではないかという2点を考える。著者は血小板凝集抑制作用があるといわれている Pyrimidil-Carbamate について500KHzと低周波にて誘電上昇があるかどうか実験してみたところ, 500KHzでは400mg/dlの濃度で誘電率の変化はみられず, 200mg/dlの濃度で低周波ではわずかに容量増加を認めた。

以上の如く, 高分子の誘電率は, 単に細胞電気泳動上の問題だけでなく, 血液凝固機構の上でも重要な問題であるので, さらに精度のよい誘電率計が作られ,

より正確な測定が早くなされるよう希望する。

次に細胞の大きさと易動度の関係であるが、すでに1930年代にいろいろ討論され、一応の結論が出ており、同一物質である範囲の大きさの粒子には、ある決まった速度があるというものであった。それによると¹¹⁾、まず Smoluchowski が $U = C \frac{\zeta E D}{\eta}$ なる式を出し、 C の定数として $\frac{1}{4\pi}$ が粒子の形によらない定数と主張した。(ζE は泳動により計算される ζ 電位である)。これに対して Debye と Hückel が球に対しては $-\frac{1}{6\pi}$ を、円柱に対して $\frac{1}{4\pi}$ が適当とした。さらに Mooney¹²⁾ は水中でのパラフィンオイルやその他の粒子の泳動から、直径20 μ 位迄の小さい粒子では、粒子が大きい方が易動度が大きいことをみており、Henry¹³⁾ は $U = \frac{\zeta D}{6\pi\eta} f(ka)$ なる理論を出した。 $f(ka)$ の k の逆数は ζ 電位を形成している電気二重層の厚さであり、 a は粒子の半形で、 ka の函数によって定数 C が決まるといものである。この k は $\sqrt{\frac{4\pi Ne^2}{1000DKT} \sum C_i Z_i^2}$ で表わされ、本実験に用いたブドウ糖溶液とS.S.を合せたメジウムでは、 D を80と仮定すると、約 $6.8 \times 10^6/cm$ となった。したがって ka は、単一の赤血球で約 2.7×10^8 となり、NaCl のような1-1電解質のメジウムならば Smoluchowski の $\frac{1}{4\pi}$ の範囲に入る。著者の泳動した抗体によって凝集した赤血球の大きさを a として計算しても、やはり ka は1-1塩のメジウムでは $\frac{1}{4\pi}$ の式が当てはまる範囲に入るが、実際に用いたのは1-1塩ばかりでないで、Henry の表からみると、必ずしもあてはまらないようである。実験的には単一の赤血球と凝集塊の間で差異が認められた事は事実である。Abramson¹⁴⁾ や Freundlich らは多形核白血球、血小板、赤血球などを、単一の細胞と凝集体とを血清や血漿中で泳動し、両者にほとんど易動度差がないことをみた。次に抗体を用いての実験結果についてであるが、細胞や赤血球は、抗体が表面に附着すると易動度が低下することは、多くの人に認められているので、単一の赤血球の方が凝集赤血球より抗体附着が少ないのではないかという疑問も出るが、抗体濃度を異にした試料で行なったのではなく、同一試料で泳動しているため、その可能性は少なく、著者は Smoluchowski の理論があてはまるものであれば、凝集塊が大きくて、泳動槽の静止面からはみ出る部分が出てくるための誤差が関係するものと考えざるを得ない。Abramson 等の形や大きさによらないとする観察は、写真に撮影されたものでなく、また必ずしも静止面で

測定していないので、著者とは条件が異なり、その結果に差異が生ずることもありえよう。以上より極端に大きい凝集塊の泳動は易動度が低いので、細胞電気泳動としてはさけるべきであろう。

結 語

赤血球電気泳動を用い、細胞電気泳動の結果がより一般的な値として表現される可能性を求めて、メジウムの粘度や誘電率の影響について実験し、また泳動粒子の大きさと易動度の関係を追求し、次の如き結果を得た。

1. ζ 電位の計算には、泳動メジウムの誘電率が必要であるが、市販の卓上型誘電率計(500KHz)では、P. V. P., Ficoll, Dextran Glucose の各水溶液の誘電率は水の誘電率と大差がなかった。
2. 自作の低周波(500~20KHz)を用いた誘電率計では、電解質の存在下では不安定な値を示したが、これらの各水溶液はいずれも水の誘電率より高値を示した。
3. Glucose の濃度のみをかえた泳動メジウム中での人赤血球の泳動では、濃度の高い程、易動度が低く、従って ζ 電位と電荷密度は逆に高く計算された。メジウムの誘電率が Glucose により上昇すると仮定して計算すると、この傾向は小となった。
4. 人赤血球の泳動中の撮影による写真上にて赤血球の大きさと易動度を対比させてみたが、大きさと易動度の間に一定の傾向はみられなかった。
5. 抗体を用いて凝集塊を形成した人赤血球は、抗体が附着した単一の赤血球より易動度が低下した。このことから、細胞電気泳動は極端に大きな細胞、又は細胞塊の泳動時には誤差が大きく出る恐れがあると考えられた。

本文の要旨は昭和46年5月22日第21回電気泳動学会総会において発表した。

文 献

- 1) Pollack, W., Hager, H. J., Reckel, R., Toren, D. A. and Singher, H. O. : A study of the forces involved in the second stage of hemagglutination, *Transfusion*, 5: 158-183, 1965
- 2) 林桂一著、森口繁一増補：高等函数表、岩波書店、p. 19, 1967

- 3) 日本化学会編：化学便覧，p. 591，丸善，東京，1954
- 4) 高島士郎：生物物理化学研究法 1，pp. 303-320，東京，1969
- 5) 下沢隆：誘電率の解釈（有機化学における物理的方法 7 卷），共立出版
- 6) Wehinger, H. : Zur Beeinflussung der Blutgerinnung durch niedermolekuläres Dextran, Klinische Wschr., 45 : 1031-1035, 1967
- 7) Ross, S. W. and Ebert R. V. : Microelectrophoresis of blood platelets and the effects of Dextran, J. Clin. Invest., 38 : 155-160, 1959
- 8) Haydon, D. H. : The surface charge of cells and some other small particles as indicated by electrophoresis Biochim. Biophys. Acta., 50 : 450-457, 1961
- 9) Hummel, K. and Szczepanski, L. V. : Quantitative Untersuchungen über die Binding von Polyvinylpyrrolidon an die Erythrozytenoberfläche, Blut., 9 : 145-164, 1963
- 10) Pollack, W. and Reckel, R. P. : The zeta-potential and hemagglutination with Rh antibodies. A physiochemical explanation, Int. Arch. Allergy, 38 : 482-496, 1970
- 11) Abramson, H. A. : Electrophoretic phenomena and their application to biology and medicine, 102-121, The chemical Catalog Company, Inc, Newyork, 1934
- 12) Mooney, M. : Electrophoresis and the diffuse ionic layer, J. Physical. Chem., 35 : 289-308, 1931
- 13) Henry, D. C. : The cataphoresis of suspended particles, Proc. Roc. London, 133 : 106-129, 1931
- 14) Abramson, H. A. : The influence of size, shape, and conductivity on cataphoretic mobility and its biological significance, J. Physical Chem., 35 : 289-308, 1931

(1973. 12. 15受稿)