

13・5 組織細胞を用いた診断法の開発的研究

富山大学和漢薬研究所病態生化学部門

荻田善一

ま え が き

血清、尿などの体液試料ならびに血球、羊水細胞、組織片や毛根などの細胞試料の微量を用いて病態変化に関する情報を得、診断し得るに適した微量電気泳動装置を考案し、遺伝性疾患児の出生前診断あるいは保因者診断に適用し得ることを検討してきた。

研 究 目 的

組織細胞ならびに体液の微量を試料として病態の生化学的解析をおこなうに適した微量電気泳動法の普及を計るためより簡便な方法を検討することを目的とする。

研 究 方 法

(1) ゲル薄層調製装置の試作

垂直式微量電気泳動法を普及させるためには、最も技術の要求されるグラジエントアクリルアミドゲル薄層の調製過程を簡易化する必要がある。このため同一条件で同時にゲル薄層を調製するための装置を試作した。

図1にゲル薄層調製装置の一部を示してある。本装置の本体はアクリル樹脂板(厚さ:5mm)より構成されている。底の部分は四角錐の先端が切り取られた型をしており、その部分に溶液の噴出部分がある。この噴出部分には、溶液を滑らかに噴出させるための部品を接着してある。ゲル薄層調製の原理は、二枚のガラス板(8.3cm×10.2cm)を1.5mmずらした間に1mmの厚さの塩化ビニールのシート(5mm×11.5mm)2本をはさみ、スコッチ絶縁テープで両側をとめる。ここに形成された2枚のガラス板で構成されたゲル薄層枠を24枚をゲル調製装置に置く。

先ず、触媒溶液(C)を用いてよく洗う。次いで表1に示した濃度の異な

たアクリルアミド単体混合液をグラジエントメーカーを用いて混合し、静かに調製容器の下部より噴出させ、ゲル薄層枠の部分に単体溶液のグラジエントを作らせゲル化する。この時の室温は25～28℃が最適である。ゲル薄層形成後2～4時間放置後取り出し、使用するまで4～7℃の湿室に保存する。

(2) 簡易微量電気泳動装置の試作

このゲル薄層を用いるに適するように、荻田らの考案した電気泳動装置を改良した。図2はこのような目的に適した簡易電気泳動装置の一つを示してある。まずこの電気泳動装置の側面にシリコンシート(厚さ:1mm)で作られたパッキングを置き、その上にゲル薄層を重ねクリップでとめる。

以上の操作のみで、あらかじめ調製し保存されていたゲル薄層を使用し、直ちに従来の方法に準じて同様に電気泳動をおこなうことができる。

研 究 成 果

(1) ゲル薄層調製液の組成

ゲル薄層を同一条件で同時に調製するためのアクリルアミドゲル単体溶液の組成が表1に示してある。

表1に示された処方方は1つの例であり、試薬の①、IN-HCl および ②、Tris を他の緩衝液系の試薬ととり代えることによって種々の泳動条件のゲル薄層をあらかじめ調製し、保存しておくことができる。

(2) 濃度グラジエントの検討

調製されたゲル薄層のゲル濃度の勾配が左右に濃度差がくるようにゲル薄層をおき、その全体にわたって原点となるよう長い試料溝を作る。この試料溝にヘモグロビン溶液(溶血液)を添加し泳動して、着色したヘモグロビンの移動状態から濃度のグラジエントの状態を判定できる。

考 察

本簡便法においては、ゲル薄層を調製するときのゲル重合条件の管理が最も重要である。ゲル重合温度を25～28℃とし、触媒濃度を調製することによって重合条件を調節する。

さらに安定なゲル薄層調製条件を検討したい。

要 約

組織細胞ならびに体液の微量を試料として病態の生化学的解析をおこなうに適した微量電気泳動法の普及を計るため、より簡便な方法を検討することを目的とした。

ゲル薄層調製装置ならびに萩田らの電気泳動装置を改良することによってより操作の簡便な微量電気泳動法を得ることに成功した。

文 献

- 1) 萩田善一, 山村研一
毛根の電気泳動 臨床科学 13(9)1206-1210 1977.
- 2) 山村研一, 萩田善一, 毛根を試料とする動的病態変化の電気泳動法的解析 生物・物理・化学 20(4) 307, 1977

学 会 発 表

- 1) 萩田善一, 山村研一, 病態の微量電気泳動法による動的解析法の検討 生物・物理・化学 21(2) 95, 1977.
- 2) 萩田善一, 岩橋寛治, 山村研一, 小林 収, 岡田敏夫, 鈴木好文, 尿蛋白成分の微量電気泳動法による解析法の確立, 第27回電気泳動学会春季大会(於東京) 1977年5月27日

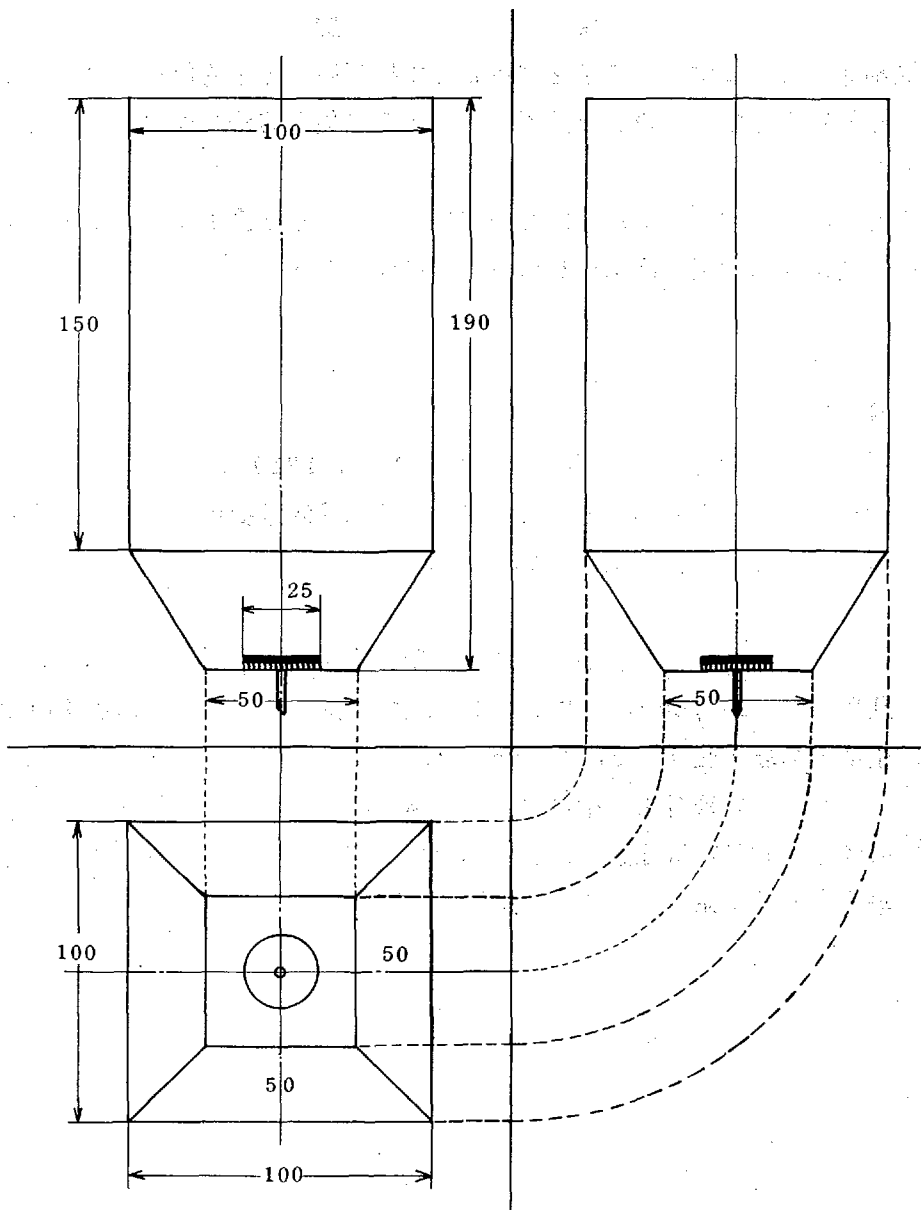


図2 ゲル薄層調製装置

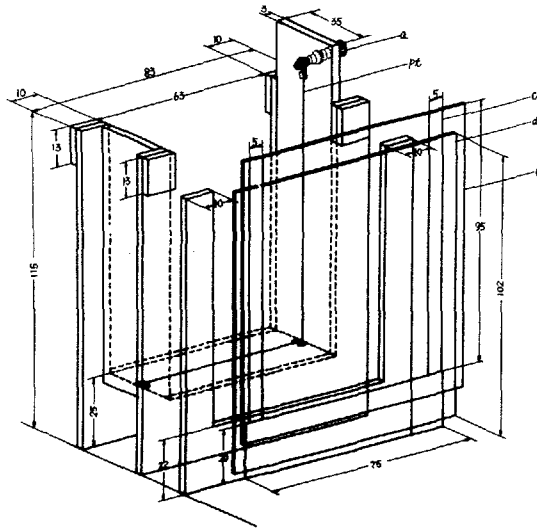


图 1 簡易微量電氣泳動裝置

表 1

Reagents for 4-17% Polyacrylamide Gel Gradient

Reagent	A(4%)	B(17%)
1. 1N-HCl	30.0 ml	30.0 ml
2. Tris	22.8 g	22.8 g
3. Acrylamide	38.0 g	161.5 g
4. N,N'-Methylene-bisacrylamide	2.0 g	8.5 g
5. Glycerin	100.0 ml	100.0 ml
6. H ₂ O (Total volume)	1,000.0 ml	1,000.0 ml
7. TEMED	1.5 ml	0.75ml
8. AP(10%) solution	3.0 ml	3.0 ml

Components 1 to 6 were dissolved, and cooled to approximately 4°C, TEMED and ammonium persulfate (AP) were added immediately before pouring into the gradient mixer.

C solution: 1.5ml TEMED and 3ml AP(10%) solution were dissolved with 3,000ml of distilled water.

↓ 検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用 ↓
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります

まえがき

血清,尿などの体液試料ならびに血球,羊水細胞,組織片や毛根などの細胞試料の微量を用いて病態変化に関する情報を得,診断し得るに適した微量電気泳動装置を考案し,遺伝性疾患児の出生前診断あるいは保因者診断に適用し得ることを検討してきた。