

頸管粘液ムチンの分離とその若干の性質

聖マリアンナ医科大学産婦人科学教室

佐 賀 正 彦 浜 田 宏

はじめに

頸管粘液はゲルの構成に与る糖蛋白—高粘性分 high viscosity component (HVC)—と血清蛋白群, 電解質, 糖類等—低粘性分 Low viscosity component (LVC)—を構成成分とする分泌物で上皮性 mucin の一つである (Davajan et al. 1970). この粘液の物理的性質の粘弾性, 牽糸性(曳糸性)はHVCによるといわれ, 古くからレオロジー領域の研究の対象とされてきた (Clift 1945) が, 我々は粗粘液よりHVCを分画精製し, この生体高分子の物性解析をレオロジーの概念を導入し行っているが, ここではムチン分離法とその若干の性質について報告する。

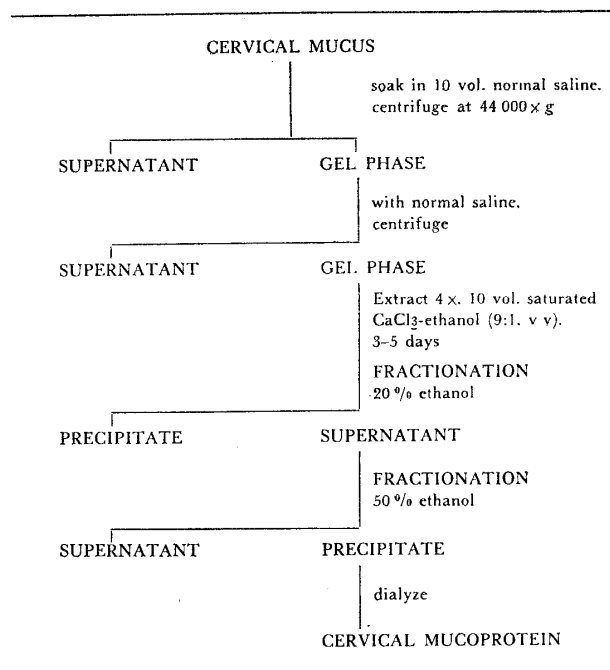
研究材料

頸管粘液は排卵期周辺に Tuberculin 注射器(ガラス乾燥, disposable 合成樹脂)に吸引, 又は Davajan-Kunitake (1969) に従い polyethylene suction catheter (French size #14) に10ml 容量注射器を接続し腔部鉗子或は反型無鉤鉗子で空気の吸入を防止しつつ吸引採取後注射器, カテーテルを直ちに冷凍庫に入れ凍結(−20℃以下)保存し, 使用時に融解混合した。1回の処理は minimum 20ml の材料を用いた。

ムチン分離法

Gibbons (1959) 法を若干改変して行つた (図1). 粗粘液の約10倍の生食水又は純水を加え攪拌後0℃に24時間静置後, 44,000 g, 60分, 0℃にて遠沈上澄をゲル相から除き, 同様の洗滌操作を数回繰り返す。ゲル相に10倍容の飽和 CaCl_2 溶液(飽和 CaCl_2 : 無水エタノール 9:1 v/v)を加え, 0℃~4℃に静置時折攪拌する。3~5日でゲルは溶媒に溶解し曳糸性を有する溶液となる。エタノール濃度を20% (v/v) に上げ静置後, 0℃, 44,000 g, 60分遠沈し残渣を除去, 上澄は

図1 子宮頸管粘液ムチン分離法



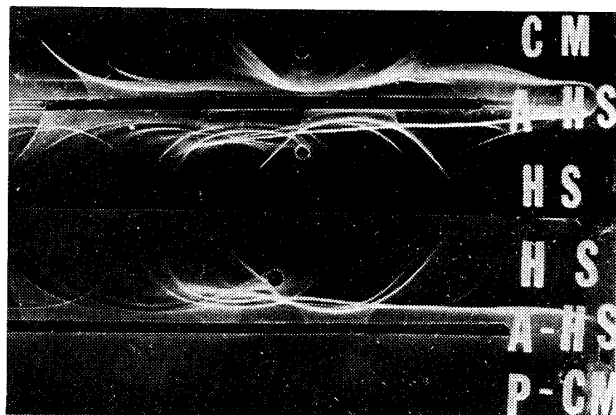
更にエタノール濃度50%にする。曳糸性は殆んど消失し白濁を認める。0℃, 24時間後44,000 g, 60分遠沈し, 管壁に白色沈降を得る。上澄を去り前記の飽和 CaCl_2 液を加え再び溶解後, 50%エタノールとし沈降を得, 上澄は除く。沈降物を再度上記溶媒に溶解, セロファンチューブを使用, 純水, 0.05M-EDTA液, 純水の順に充分透析後凍結乾燥し, 白色線維綿状物を得た。収率は約10ml粗粘液あたり10~50mgであつた。

精製ムチンの性質

(1) 乾燥ムチンは白色綿状で, 純水を加えると不溶性の透明膨潤ゲルとなり索糸性を有し排卵期の粗粘液様の所見を呈する。これをスライドガラス上にて乾燥させると無定形固体となり, 結晶形成は認められない。(2) 純水中のゲルは攪拌と静置を繰り返すことにより24~72時間で粘稠な

写真1 免疫電気泳動

CM: 粗頸管粘液, A-HS: 抗人全血清, HS: 人血清, P-CM: 分離ムチン



均質溶液を得ることが出来る。約1%溶液を使用した免疫電気泳動では抗全人血清との沈降線は認められず(写真1)アセテート膜電気泳動(HR緩衝液pH 8.6)で泳動されず(non migrating)原点がボンソーSに弱染し, PAS反応, alcian Blue 染色で強く染色された。ディスク電気泳動(Canalco 7%アクリルアミド)で試料は濃縮ゲルに止り分離用ゲルに Amidoschwarz, PAS, Alcian Blue の各染色に陽性のバンドは認められなかつた。又一連の Sephadex を通過しえず, Sepharose 6B による濾過も不調に終つた。(3) 約0.5%のムチン溶液(0.2M LiCl-Lithium citrate 緩衝液pH 6.8)を用いた超遠心沈降速度法(Spinco-E 型超遠心機)にて沈降界面が一峰の移動を認めた。(4) 精製ムチンのシアル酸含量は3~5%であつた。

考案および総括

上皮性ムチンは化学的に糖蛋白でありフコース, シアル酸を含有するといわれる。ここに分離

したムチンもシアル酸を含み, PAS, Alcian Blue で強く陽性を呈し糖蛋白としての特性を有し, 更に電気泳動上血清蛋白を証明しえず単一成分として泳動原点に止る(non-migration). これはゲル濾過法にていずれのゲルの pore をも通過しえないことも含めて極めて巨大な分子或は分子群を想定せしめる。一方乾燥ムチン物質が純水中に静置されると不溶性の膨潤ゲルを呈し, 攪拌静置により溶解し粘稠な溶液を示すことは, 鎖状ムチン高分子が相互にからみ合い架橋され(cross-links)網状構造を形成し, この間に溶媒が侵入し膨潤したゲルを呈する。このからみ合いが解けると弾性ゲルは消失し粘性溶液となると解釈される。即ちムチンの粘弾性は分子のからみ合いによる網状構造が本態であり, これは弱い応力に対し変形し応力の解除により変形は元に復する(弾性)が, しかし応力が強いと網状構造がこわれ, からみ合いが解かれることにより流動し変形はもはや旧に復さない(粘性)。もう一つのムチン物質の特徴はシアル酸のカルボキシル基の存在で, こうした解離基が多数存在することから, 陰性荷電の高分子電解質(polyelectrolyte)と考えられることである。その物性は又特異的であり, その詳細については漸次報告する予定である。

文 献

- Clift, A.F. (1945): Proc. R. Soc. Med. 39: 1.
 Davajan, V. and Kunitake, J.M. (1969): Fertil. Steril. 20: 197.
 Davajan, V., Nakamura, R.M. and Kharm, K. (1970): Obstet. Gynecol. Survey. 25: 1.
 Gibbons, R.A. (1959): Biochem. J., 73: 209.
 (No. 2799 昭49・7・10受付)