483. 血清および尿中オステオカルシンのheterogeneity (第2報)

Heterogeneity of Serum and Urinary Osteocalcin (The second report)

埼玉県立小児医療センター放射線部

○山本 英明	荒井 孝	小林 悟士
(Hideaki Yamamoto)	(Takashi Arai)	(Satoshi Kobayashi)
山口 明	池井 勝美	
(Akira Yamaguchi)	(Katsumi Ikei)	

慢性腎不全患児の血清中および尿中オステオカルシン(O.C.)のheterogeneityについて検討を行い、intact O.C.と各種 O.C.フラグメントの存在様式について健常児と比較した。

【対象と方法】対象とした検体は、腎疾患、内分泌疾患のない健常児 2例、CAPDを施行している慢性腎不全(CRF)患児 4例の血清および尿を用いた。血清は早朝空腹時に採血し、尿は24時間畜尿の一部を用いた。カラム泳動に際しては、健常児の血清を凍結乾燥によって 5倍濃縮、尿は30倍濃縮、また CRF患児の血清および尿はそれぞれ 2倍濃縮したものを試料とした。

方法は、濃縮試料3mLをSephadex G-100カラムおよびSephadex G-50カラム(1.6×110cm, Pharmacia Fine Chemicals, Sweden)にて各々溶出した。溶出液は50mM重炭酸アンモニウム溶液、フラクションサイズは3.3mL/tubeである。溶出した試料は 280nmにて吸光度測定し、凍結乾燥により約10倍に濃縮後、O.C.濃度の測定を行った。また、一部試料についてはゲル濾過後その活性部分だけを回収して、水-アセトニトリル(ACN)-トリフルオロ酢酸系の逆相HPLC(YMC R-ODS-5 4.6×250mm)を用いて精密測定を行った。O.C.濃度測定は、BGP IRMAキット“三菱油化”を用いた。なお、分子量の目安としては α_1 -ミクログロブリン(MW 33,000)、 β_2 -ミクログロブリン(MW 11,800)およびインスリン(MW 6,000)を用いた。

【結果】①Sephadex G-100カラムによる、CRF児の血清中O.C.溶出パターンにおいては、fraction No. 38-48に一つの大きなピークが認められた。このピークは健常児の血清中O.C.溶出パターンと一致した。また、尿中O.C.溶出パターンにおいてはピークが 2つ認められ、1つは血清中O.C.溶出パターンと一致し、もう 1つはそれよりも高分子量のものであった。さらに、Sephadex G-50カラムによって詳細に分析してみると 2つのピーク比は患児間に差が認められた。

②CRF児尿の分画からintact O.C.付近を逆相HPLCによって分析したところ、intact O.C.と、それより親水性の高いO.C.様免疫活性物質との 2つのピークに分かれた。同様に、高分子量側のピークについても分析したところ、intact O.C.とそれより親水性の高いO.C.様免疫活性物質とに分かれた。

【考按】CRF 患児の血清中O.C.は、健常児と同じ溶出位置にピークが認められた。一方、尿中からはintact O.C. 様物質と推定分子量が30,000~40,000のO.C.様免疫活性物質が多量に認められた。このことからO.C.は他の低分子タンパクと類似した再吸収機構をもち、健常児では腎糸球体で濾過されたintact O.C.が尿細管で再吸収し、再吸収極量を超えた微量のintact O.C.が尿中に排泄されているものと思われた。したがって、CRF 患児は高度な糸球体・尿細管障害によって intact O.C.の再吸収される割合が少なく、intact O.C.様免疫活性物質やマルチプルな O.C.フラグメントが尿中に多量に排泄されているものと思われた。また、尿中のO.C.免疫活性物質として intact O.C.と同等の分子量で親水性の高いO.C.様免疫活性物質の存在も認められた。これはゲル濾過による溶出パターンの結果と、O.C.測定キットの抗体特異性からO.C.様免疫活性物質の存在様式を推定すると、intact O.C. から数個のアミノ酸が外れた程度ではほぼ原形を保っているO.C.フラグメントと推定された。また、高分子量のO.C.様免疫活性物質については、HPLCに伴う酸性処理(pH 2-3)で分子間の結合が切り離されたことから intact O.C.付近にピークが認められたものと思われる。したがって尿中では担体タンパクと結合して存在しているものと推定された。

【結語】尿中O.C.の存在様式は、今回の検討結果から明かなように intact O.C.としても多様性があり、且つ、前回報告したように低分子に分解されたO.C.フラグメントも存在することが推測された。このようなマルチプルなO.C.フラグメントの存在は、濾過されたO.C.の再吸収、代謝あるいは担体タンパクの存在による影響が大きな要因と思われた。