尿路結石形成に関する尿中 α_1 globulin 領域の蛋白の役割について

特に血清 α_1 globulin 領域の蛋白の CaCO_3 凝集効果

東北大学医学部泌尿器科学教室 木 崎 徳

THE ROLE OF URINARY PROTEINS OF α_1 GLOBULIN FRACTION IN THE FORMATION OF URINARY CALCULI WITH SPECIAL REFERENCE TO THE AGGREGATING EFFECT OF SERUM α_1 GLOBULIN ON CaCO_3 SUSPENSION

Noboru Kisaki

Department of Urology, Tohoku University School of Medicine, Sendai

It is well known that not only patients with renal disease but healthy individuals also excrete proteins in the urine. However, the role played by urinary protein in the formation of stones is not as yet clearly understood. The present study was undertaken to determine if urinary protein has an action to form a stone and if so what types of protein possess such an action.

Materials and Methods: Normal human serum was separated into fractions by the use of ammonium sulfate and further refractionated with DEAE cellulose. Each of the fractions thus obtained was tested for its stone-forming action by measuring the increase in the sedimentation rate of a suspension of CaCO_3 fine particle and the change in ζ -potential of this suspension that occurred on addition of these fractions. Also, proteins separated by electrophoresis through a cellulose acetate film were identified.

Results: Proteins of γ - and β -globulin fractions were found to exert little aggregating action on CaCO_3 suspension. Most marked aggregation and precipitation of the colloidal substance were observed with proteins of α_1 -globulin fraction or with a mixture of α_1 -globulin and albumin.

From these findings it was considered that proteins of α_1 -globulin fraction or a mixture of proteins of α_1 -globulin and albumin in urine are the most likely predominant factor in the formation of stones in urine.

結 言

我々は前報¹⁾で炭酸カルシウム微細粒子の suspension 溶液の sedimentation rate および zeta-potential を測定することにより、尿路結石の発生に関する matrix substance の役割について報告した。すなわち、matrix substance が尿中 colloid 粒子の zeta-potential を減少させることにより、colloid の凝集が起り、これが沈澱したのち、適当な運動エネルギーが与えられると凝塊が形成されてくる。これが核となつて結石が形成されるのではないかと報告した。

このように凝集作用をもち、matrix substance となり得る尿中排泄物のうち、これまで酸性ムコ多糖類が主に注目されて来たが、我々は凝集作用のある尿中排泄物は

これだけではなく、albumin などの蛋白も凝集作用をもっていることを前報で報告した。

一方、腎病変時のみならず、健康者においても、血清中に存在しているときは変つた形であつても血清由来の蛋白が尿中に排泄されるが、この尿中蛋白が尿路結石の発生にどのような役割をもつか不明である。

そこで今回、ヒト血清を分画し、各画分における尿中 colloid の凝集、沈降能力を炭酸カルシウム suspension 溶液の zeta-potential および sedimentation rate で測定し、結石形成に強く作用している蛋白を検索した。

実験材料および方法

1. 実験材料

硫酸分画, DEAE cellulose 分画のため 正常ヒト血清

280ml を使用した（血清 A）．別に，高濃度の硫酸で蛋白を分画するため，さらに正常ヒト血清280ml を使用した（血清 B）．

2. 血清蛋白の硫酸分画

上記のヒト血清280ml（血清 A）に硫酸を順次，最終濃度が10％，20％，30％となるように加えた．硫酸は常温にて少量ずつ加えて沈澱を起こした．硫酸の各濃度における沈澱をそれぞれ遠心分離（10,000rpm，15分間）した．各々の沈澱と30％硫酸を加えた後の上清を蒸水にて透析した．透析は4℃にて行ない，蒸溜水は1日1回交換し，3日間行なつた．なお，上清の透析は6日間行ない，十分に透析した．透析後35～40℃にて回転濃縮し，凍結乾燥を行なつた．

別の280ml の血清（血清 B）に対しては34％になるように硫酸を加えて沈澱させ，この沈澱を除去（10,000 rpm，15分間遠心分離）した上清に最終濃度が50％および68％となるように硫酸を加え，50％および68％飽和の沈澱を得，この沈澱を上記と同様の方法で透析，濃縮，凍結乾燥を行なつた．

3. DEAE-Cellulose column による分画

硫酸分画によつて得られた粗画分の蛋白を内径2.2 cm，高さ25cm，容積95cm³ の DEAE-Cellulose column に通し，0.01M phosphate buffer (pH 6.8)，0.05M phosphate buffer (pH 6.8)，0.1M phosphate buffer (pH 6.8)および0.1M phosphate buffer+0.1M NaCl 溶液（等量混和pH 6.8）を各500ml ずつ流し，順次溶出し，順次溶出した（表1）．

溶液中の蛋白量は spectrophotometer（日立製作所製，Model 110）を用いて自動記録装置に接続し，280nm で吸収測定した．得られた蛋白を各 peak ごとに集め，3日間蒸溜水にて透析したのち，35～40℃で回転濃縮し，凍結乾燥を行なつた．

4. 蛋白の電気泳動

上記の方法で得られた蛋白画分0.5mg を0.2ml の生理的食塩水に溶解し（0.25％），veronal buffer (pH 6.8) に浸した Cellulose acetate 膜上に10μg ずつ apply した．

電気泳動の条件は cellulose acetate 膜の幅1 cm につき1 mA を流し（220V），40分間電気泳動した．電気泳動終了後は cellulose acetate 膜上の蛋白を Amido Black 10B および PAS にて染色した．尚，cellulose acetate 膜は常光産業製 Separax を使用した．

5. 炭酸カルシウム suspension 溶液の作成法

表 1 DEAE Cellulose Columnによる分画（画分 4 150mg を分画）

DEAE Cellulose Column (内径 2.2cm, 高さ 25cm, 容積 95cm ³)	
0.01 M phosphate buffer で溶出..... P 1	↓ (pH 6.8)
0.05 M phosphate buffer で溶出..... P 2	↓ (pH 6.8)
0.1 M phosphate buffer で溶出 P 3	↓ (pH 6.8)
0.1 M phosphate buffer (pH 6.8) + 0.1 M NaCl で溶出	P 4

表 2 硫酸分画による血清蛋白の分画（血清 280ml）

画 分		収 量 (g)
血清 (A)	1	1.01
	2	5.62
	3	10.49
	4	0.36
血清 (B)	5	0.21
	6	0.18

血清 (A) { 画分 1 10%硫酸で沈澱したもの
画分 2 20%硫酸で沈澱したもの
画分 3 30%硫酸で沈澱したもの
画分 4 画分 3 の上清
血清 (B) { 画分 5* 50%飽和で沈澱したもの
画分 6* 68%飽和で沈澱したもの
* 34%硫酸で上清にきた画分について実施

表 3 DEAE-Cellulose Column による分画（画分 4，150mg を分画）

分 画	収 量 (mg)
P 1	3.6
P 2	10.0
P 3	67.4
P 4	9.2
合 計	90.2

炭酸カルシウム粒子の zeta-potential および sedimentation rate の測定法．

直径約 8 μ にした炭酸カルシウム微細粉末の suspension を使用し，前報¹⁾と同様の方法で，この suspension の sedimentation rate および suspension 粒子の zeta-potential を測定した．これらの方法により炭酸カルシウム suspension 粒子に対する上記の分画した蛋白の凝

集効果を測定した。

分画した蛋白を加えたときの CaCO_3 suspension の pH は Lab-O-meter (Beckman-Toshiba 製) にて測定した。

実験成績

1. 硫安分画による収量

血清 A に 10%, 20% および 30% になるように硫安を加えた際の沈澱および 30% になるように硫安を加えた上清より得られた蛋白分画をそれぞれ画分 1, 画分 2, 画分 3 および画分 4 とした。また血清 B の 50% および 68% 硫安飽和により得られた蛋白をそれぞれ画分 5 および画分 6 とした。

各画分の収量は表 2 の通りである。すなわち、画分 1, 1.01g; 画分 2, 5.62g; 画分 3, 10.49g; 画分 4, 0.36g; 画分 5, 0.21g; 画分 6, 0.18g であった。

2. CaCO_3 suspension の zeta-potential および sedimentation rate に対する硫安による粗画分蛋白の影響。

各画分の蛋白を CaCO_3 suspension に最終濃度が 10^{-1} ~ $10^{-5}\%$ となるように加え、この suspension 粒子の sedimentation rate と zeta-potential の変化を測定した。

画分 1, 画分 2 および画分 6 では $5 \times 10^{-3}\%$ および $10^{-2}\%$ と比較的高濃度に加えたときのみ沈降速度の亢進が認められた (図 1, 2, 3)。画分 3 では 10^{-3} および $5 \times 10^{-3}\%$ で CaCO_3 粒子の沈降促進が認められたが、 $10^{-3}\%$ の濃度では沈降速度がかなり遅れるのが認められた (図 4)。これに対し、画分 4 は $10^{-3}\%$ および $5 \times 10^{-3}\%$ で、また、画分 5 は $5 \times 10^{-3}\%$ および $10^{-3}\%$ で著明な沈降速度の亢進が認められた (図 5, 6)。

つぎに CaCO_3 粒子の zeta-potential の変動についてみると画分 1 および画分 2 ではこれらの画分の濃度が $5 \times 10^{-3}\%$ 附近より減少がはじまり、どちらも $10^{-2}\%$ 附近で電位は 0 となり、これより高濃度では電位の逆転が認

図 1 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する画分 1 の効果

図 2 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する画分 2 の効果

図 3 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する画分 6 の効果

図 4 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する画分 3 の効果

図 5 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する画分 4 の効果

図6 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する画分5の効果

図7 CaCO_3 Suspension 溶液中の ζ -Potential に対する血清蛋白画分の効果

図8 CaCO_3 Suspension 溶液中の ζ -Potential に対する血清蛋白画分の効果

められた (図7). 画分3および画分6では $10^{-3}\%$ 附近より zeta-potential の減少が起り、 $5 \times 10^{-3}\%$ 附近で電位が0となり、それ以上の高濃度では電位が逆転した (図7, 8). また画分5は $5 \times 10^{-4}\%$ より電位の低下が起り、 $10^{-3}\%$ 附近で0となりこれより高濃度になると電位の逆転がみられた (図8). 一方、画分4は、 $10^{-4}\%$ 附近より電位の低下しはじめるのが認められ、 $5 \times 10^{-4}\%$ と $10^{-3}\%$ の間の濃度で電位が0となり、これより高濃度になると電位の逆転が認められた (図7). すなわち、zeta-potential の変化よりみると、画分4の CaCO_3 suspension に対する凝集作用は画分1~6の中で最も強

いことが判明した. 画分4は、画分5と画分6およびその上清に含まれる成分の混合物とみなされるので、68% 硫酸上清に含まれる成分もかなり重要な役割を演じているものと考えられる.

3. DEAE-cellulose column による分画

硫酸分画により得られた血清蛋白の粗画分のうち、画分4が CaCO_3 suspension 粒子に対して最も強い凝集能力をもつことが判明したので、この画分150mg を DEAE-Cellulose column にて再分画した.

画分4を DEAE-Cellulose column に通し、0.01M, 0.05M, 0.1M phosphate buffer および0.1M phosphate buffer に0.1M NaCl 溶液を等量加えた溶液で順次溶出すると、図9のような4つの明瞭な peak が得られた. これらの peak を出現の順に P_1 , P_2 , P_3 , および P_4 とすると、これらの peak を含む各 fraction より得られた蛋白の収量は表3の通りである. すなわち、 P_1 , 3.6 mg; P_2 , 10.0mg; P_3 , 67.4mg; P_4 , 9.2mg で総計 90.2mg であり、この収量は Column を通す前の150mg に対し、60.1%であつた. また各 fraction の割合は、 P_1 , 3.9%; P_2 , 11.1%; P_3 , 74.7%; P_4 , 10.2%と

図9 DEAE-Cellulose による分画 (硫酸画分4, 150mg を溶出)

図10 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する P_1 の効果

が最も多かつた。

4. DEAE-Celluloumn による分画より得られた蛋白の CaCO_3 suspension の sedimentation rate および zeta-potential に対する影響。

まず得られた各画分の sedimentation rate に対する影響についてみると、 P_1 *では CaCO_3 suspension はどの濃度においても全く沈降しなかつた (図10)。 P_2 では、 CaCO_3 suspension の沈降は $10^{-2}\%$ と比較的高濃度においてのみ認められ (図11), P_4 では $10^{-3}\%$ および $10^{-2}\%$ にて suspension の沈降が認められた (図12)。これらに対し、 P_3 は $5 \times 10^{-4}\%$ および $10^{-3}\%$ の濃度で著明に沈降す

図11 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する P_2 の効果

図12 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する P_4 の効果

図13 CaCO_3 Suspension 溶液の沈降速度に対する P_3 の効果

図14 CaCO_3 Suspension 溶液中の ζ -Potential に対する DEAE-Cellulose 分画で得られた各画分の影響

るのが認められた (図13)。

*脚注: P_1 の収量が少ないため、 $10^{-2}\%$ の濃度のものは作れず、 $5 \times 10^{-3}\% \sim 10^{-5}\%$ の間の濃度において sedimentation rate および zeta-potential の変化を測定した。

つぎに、これらの各画分の蛋白を加えたときの zeta-potential の変動についてみると、 P_1 では zeta-potential は $10^{-5} \sim 5 \times 10^{-3}\%$ の間で殆んど変化しなかつた (図14)。 P_2 では $5 \times 10^{-4}\%$ の濃度で zeta-potential の減少しはじめるのを認め、さらに高濃度になると電位が減少し、 $5 \times 10^{-3}\%$ 附近で 0 となるのが認められた。これより高濃度では電位は逆転した。 P_3 では $10^{-4}\%$ 附近より zeta-potential の減少が始まり、 $5 \times 10^{-4}\%$ 附近で 0 となり、さらに高濃度になると電位の逆転を認めた。 P_4 を添加した場合には $5 \times 10^{-4}\%$ 附近より zeta-potential が減少し始め、 $10^{-3}\%$ 附近で電位が 0 となり、それより高濃度になると電位が逆転するのが認められた。

以上の成績より各画分の CaCO_3 の suspension に対する凝集効果を sedimentation rate および zeta-potential の 0 となる濃度を指標として比較すると、 P_3 が最も強く、 P_4 がこれに次いだ。 P_2 は凝集作用が弱く、 P_1 は殆んど凝集作用をもたないと考えられた。

5. DEAE-Cellulose Column による分画より得られた蛋白の電気泳動。

41歳健康男子の血清を対照とし、Cellulose acetate 膜による電気泳動を行なつた。

P_1 は γ -globulin 領域の蛋白のみ認められ、 P_2 は β -globulin 領域の蛋白が主成分をなし、これに α_1 -globulin, albumin および prealbumin が極く軽度存在するのが認められた (図15)。 P_4 は albumin が主成分であり、こ

図15 DEAE-Cellulose 分画の電気泳動

Cellulose Acetate 膜による電気泳動。各分画を0.25%の溶液にし、10 μ l ずつ apply. Cellulose Acetate 膜 1 mA/cm で40分間電気泳動した後、Amido Black 10 B にて染色した。

図16 P₃ の電気泳動

図15と同じ条件で電気泳動後、PAS および Amido Black 10 B にて染色。Amido Black 10 B にて染色されている矢印の部分に一致して PAS にも染色されている。

れに α_1 -globulin に一致する薄い Band が認められた。一方、最も強力な凝集作用を示した P₃ には albumin の濃厚な Band の他に α_1 -globulin に一致するかなり濃厚な Band が認められた。

さらに P₃ についてのみ同様な電気泳動を行ない、Amido Black 10B および PAS で染色を行なうと α_1 -globulin 領域の蛋白の部分に一致して PAS 染色陽性の Band が認められた (図16)。

6. 血清蛋白各分画を加えたときの CaCO₃ suspension 溶液の pH.

今回の実験で得られた蛋白の各分画を加えたときの

CaCO₃ suspension の pH の変動はすべて7.8~8.5の間にあつた。この変動の範囲は CaCO₃ suspension の sedimentation rate および zeta-potential に殆んど影響を与えないことが判明している¹⁾、各分画を加えた際の pH の変動による sedimentation rate および zeta-potential への影響は殆んどなかつたと考えられる。

考 按

腎病変時のみならず正常者の尿中にも蛋白の排泄されていることは広く認められている。この蛋白量は報告者により多少異なるが、1日数10mg から数100mg であるとされている^{2) 3) 4) 5) 6) 7) 8)}。免疫電気泳動法により、これらの蛋白の種類を検討すると、 α_2 および β lipo-protein などの巨大な蛋白を除いて殆んどすべての血清蛋白が、血清の中に存在する形のままとはいえないまでも尿中に認められている^{9) 10)}。また尿中蛋白は被検者によつても異なるが、血清蛋白の数千~数万分の1程度である¹¹⁾。そして血清に比べ、albumin が相対的に少なく、globulin が多いこと、特に α_1 および α_2 globulin が多いとされている^{3) 10)}。

つぎに病的状態、とくに糸球体腎炎、腎盂腎炎および尿路結石症における尿中蛋白の排泄についてみると、一般に糸球体腎炎では尿中に albumin の排泄が多く、globulin は少ないと報告され、腎盂腎炎では albumin の排泄量はやはり多いが、globulin の尿中排泄量が多くなり、albumin と同程度の排泄量が認められている¹²⁾。この際の globulin の増加は α , β , γ 各領域の globulin の増加が認められるが、特に β および γ globulin の増加が著しいとされている。

一方、Boyce¹³⁾ は非感染性の尿路結石症の患者における24時間尿中の蛋白の総排泄量は正常者に比較してあまり増加していないが、その性状にはかなり相違のあることを指摘している。彼は分子量20,000以上の veronal buffer に可溶性の尿中蛋白を RS-1 Fraction と名づけて分類しているが、この中には albumin, α_1 , α_2 globulin, β globulin および γ globulin が含まれる。このうち α_1 globulin は正常者では RS-1 Fraction の4.6%に過ぎず、また腎盂腎炎でも2.8%なのに対し、尿路結石症では28.4%と多量に排泄されていることを報告している。またこのような相対的增加のみならず、腎盂腎炎の患者、あるいは正常者に較べ尿中 α_1 globulin の絶対量も増加していることを示している。

今回、このような α_1 globulin が尿路結石の発生になんらかの役割をもつかどうかを検討する目的で本実験を

行なつたものである。

正常ヒト血清を用いてまず硫安分画を行なつた。最終濃度が10%, 20%および30%になるように硫安を加え、血清蛋白の粗分画を行ない、さらに別の血清にて50%飽和および68%飽和の硫安分画を行なつた。この方法では分子量の大きい蛋白より順次沈澱することが認められている。硫安を10%, 20%, 30%となるように加えたときの沈澱および30%硫安加の上清より得られた蛋白を、それぞれ画分1, 画分2, 画分3および画分4とし、さらに別の血清の50%硫安飽和による画分と画分5, 68%飽和による画分を画分6とした。そしてこれらの粗画分の蛋白が、尿中コロイドに対してどのような凝集, 沈降作用をもつか CaCO_3 suspension 溶液にこれらの画分を加えたときの suspension 粒子の zeta-potential および sedimentation rate の変化を測定することにより検討した。なお, zeta-potential および sedimentation rate の測定法は既報¹⁾にて報告した。

今回の実験においては、炭酸カルシウム suspension 溶液を凝集効果の測定法の材料として選んだが、これは炭酸カルシウムの結石が稀であつても無いわけではないこと、さらに磷酸カルシウム、磷酸カルシウムの suspension に比べ非常に安定しており、凝集および沈降実験において再現性の高い成績が得られるためである。

まず CaCO_3 suspension に各画分を加えた際の sedimentation rate の亢進についてみると、画分4と画分5が最も稀薄な濃度で sedimentation rate を亢進させるのが認められた。つぎに薄い濃度より次第に高濃度に各画分を加えた際の zeta-potential の変化についてみると、画分4が最も低い濃度で電位の減少がはじまり、また最も低い濃度で電位が0となつた。zeta-potential が減少し、0となることは suspension 粒子の凝集の起こることを意味し、また電位が逆転して大きくなると、逆に粒子の分散が起こってくる。このため濃度が大きくなるに従い suspension 粒子の沈降速度が亢進するが、至適の条件からずれるにつれ、薄い濃度では CaCO_3 の粒子が陽に荷電、一方濃い場合には負に荷電し、いずれも分散することになる。

そこで各画分の CaCO_3 suspension に対する凝集能力を zeta-potential が0となる濃度と比較すると、画分4は画分5に対し2.5倍、画分3に対し5倍、画分6に対し10倍、画分1および画分2に対しては50倍の凝集作用のあることが認められた。

そこで、この画分4を DEAE-Cellulose column にて

再分画し、画分4の中に含まれるどの領域の蛋白がこのような凝集作用をもつか検討した。DEAE-Cellulose column で画分4を溶出すると図9のように4つの画分に明瞭に分けることができたが、それらを溶出された順に P_1 , P_2 , P_3 , P_4 と名づけるとその収量は表3の通りで P_3 が最も多く得られた。

DEAE-Cellulose Column で分離した各画分の CaCO_3 suspension 溶液の sedimentation rate に対する影響についてみると、 P_1 および P_2 を加えても sedimentation rate の亢進はほとんど認められなかつた。 P_4 では $10^{-3}\%$ の濃度で sedimentation rate の亢進がみられたが、 P_3 は $5 \times 10^{-4}\%$ と最も薄い濃度で sedimentation rate の亢進するのが認められた。

また zeta-potential の変化についてみると、 P_1 の添加によつては殆んど電位の変化がみられず、また P_2 では $5 \times 10^{-3}\%$ とかなり高濃度の添加で電位の低下が始まり、また $10^{-2}\%$ で電位が0となることが認められた。また P_4 では zeta-potential は $5 \times 10^{-4}\%$ より低下しはじめ、 $10^{-3}\%$ 附近で0となつた。これに対し、 P_3 では $5 \times 10^{-5}\%$ と他の画分に比べ最も低い濃度で zeta-potential が減少しはじめ、 $5 \times 10^{-4}\%$ と最も低い濃度で0となることが認められた。すなわち、zeta-potential が0となる濃度と比較すると P_3 は P_4 の約7.5倍、 P_2 の約50倍の凝集効果のあること、そして P_1 は凝集作用を全く持たないことが判明した。

そこでこれら画分がいかなるものか Cellulose acetate 膜にて電気泳動を行ない検討したい。

P_1 は γ globulin 領域の蛋白のみが認められ、 P_2 は β globulin 領域の蛋白が主体であり、これらの蛋白は CaCO_3 suspension に対する凝集作用は殆んどなく、結石形成には殆んど関与していないと考えられた。

P_3 および P_4 には明瞭な albumin 領域の蛋白の存在がみられ、さらに P_3 には著明な α_1 globulin 領域の蛋白の存在が認められた。さらにこの Band を PAS 染色すると陽性に染色され糖蛋白の存在が認められた。

我々は前報¹⁾で bovine albumin が CaCO_3 suspension に対して凝集作用をもつことを報告したが、この成績より P_4 の凝集作用は albumin によるものと考えられる。これに対して P_3 は最も強力な凝集効果を示したが、これは albumin に加えて α_1 globulin 領域の蛋白の存在によると考えられる。その理由は下記の如くである。すなわち、albumin は直鎖性の高分子なので suspension 粒子に対して凝集作用をもつことが考えられ、また P_3

の電気泳動で α_1 globulin に一致する Band が PAS 陽性であり、シアロ糖蛋白を含んでいる可能性が強く、球状の分子構造をもついてもシアロ酸の存在に基づく負の荷電によつて凝集効果を示すと考えられる。さらに68%硫酸飽和の画分、すなわち画分6は albumin が主体であるが、この凝集作用は P_4 とほぼ一致し、あまり強力でないこと、および albumin と globulin の存在する硫酸画分4が強力な凝集作用を示すことによる。ただ現在までのところ α_1 globulin 領域の蛋白が単独でこのような作用をもつか、albumin との共存が必要なか明確ではない。これに関しては今後検討を続ける予定である。

このような in vitro の成績を臨床面から考察すると、前述したように尿路結石患者の尿中には、Boyce¹³⁾ によると、 α_1 globulin が平均58mg/day、albumin が平均59mg/day とかなり多量の α_1 globulin と albumin が排泄されており、この際の尿量を2,000ml とすると、この両蛋白を加えた尿中濃度は $5 \times 10^{-5}\%$ となり、これだけでも P_3 の zeta-potential を減少させるはじめる濃度にほぼ近くなる。尿中蛋白の排泄量にも日間変動が認められており⁸⁾¹⁰⁾、 α_1 globulin あるいは α_1 globulin+albumin 領域の蛋白は尿中コロイドの凝集、沈降を起こす濃度に充分達し得ると考えられる。しかしながら尿中に排泄された蛋白は血清中の蛋白そのものとは考えられず、血清蛋白の凝集能力がそのまま尿中の蛋白にあてはまるとは考えられないが、これらの蛋白は結石形成の重要な因子の1つであると言えよう。

一方、前述したように糸球体腎炎、腎盂腎炎では蛋白尿が出るが、この中には α_1 globulin は少ないことが認められており、今回の成績は α_1 globulin を欠いた場合には蛋白尿が出て必ずしも結石形成に結びつかないことを示している。

結 語

尿路結石症患者においては正常者あるいは他の蛋白尿の出る疾患に比べ、尿中 α_1 globulin 排泄量の多いことが報告されているが、その生理的意義は不明である。

そこで今回 α_1 globulin が尿路結石の発生にいかなる役割をもつかを炭酸カルシウム suspension 粒子に対する凝集効果にて検討した。

実験材料および方法

正常ヒト血清280ml を最終濃度がそれぞれ10%、20%、30%硫酸で分画し、別の血清280ml を50%硫酸飽和、68%硫酸飽和で分画した。さらに DEAE-Cellulose

Column で再分画した。得られた各画分の結石形成作用を、これらの画分を加えた際の CaCO_3 微細粒子 suspension に対する sedimentation rate の亢進および zeta-potential の変化により測定した。また Cellulose acetate 膜による電気泳動法により得られた蛋白画分の種類を同定した。

成績

1) 硫酸分画による蛋白

10%、20%、30%硫酸加の沈澱より得た画分をそれぞれ画分1、画分2、画分3とし、30%硫酸加の上清より得られた蛋白を画分4とした。また50%硫酸飽和より得られた蛋白を画分5、68%硫酸飽和より得られた蛋白を画分6とした。これら画分を加えた際の sedimentation rate の亢進についてみると、画分4と画分5が最も低濃度で sedimentation rate を亢進させることが認められた。また zeta-potential についてみると、画分4が最も低濃度で電位の低下を示した。

2) DEAE-Cellulose column による分画

上記の各画分のうち、画分4が CaCO_3 suspension に最も強い凝集効果をもつことが判明したので、この画分を DEAE-Cellulose Column で分画した。0.01M、0.05M、0.1M phosphate buffer および0.1M phosphate buffer に0.1M NaCl 溶液を加えて溶出した画分をそれぞれ P_1 、 P_2 、 P_3 および P_4 とした。 P_1 および P_2 は sedimentation rate の亢進は殆んど無く、 P_3 が最も低濃度で sedimentation rate の亢進を起こし、 P_4 がこれに次いだ。

zeta-potential についてみると、 P_3 が最も低い濃度で電位の減少を起こし、次いで P_4 、 P_2 の順になつた。

P_1 では zeta-potential の変化は起こらなかった。

3) Cellulose acetate 膜による電気泳動。

P_1 は γ globulin 領域の蛋白のみであり、 P_2 は β globulin 領域の蛋白が主成分であり、 P_4 は albumin が主成分であつた。 P_3 は albumin と α_1 globulin 領域の蛋白であつた。また α_1 globulin 領域の蛋白は PAS 染色陽性であつた。

以上の成績より強い凝集作用をもつ成分は α_1 globulin あるいは α_1 globulin と albumin の共存したものによると考えられる。これらの蛋白は尿中コロイドの凝集を起こすことが考えられ、尿路結石の形成に重要な因子となつているものと思われる。

この稿を終るに際し、御指導、御校閲を賜った本学第二医化学教室吉沢善作教授ならびに東北薬科大学痛

研究所川内広明教授に深甚なる感謝の意を表する。当教室杉田篤生助教授に深謝する。また、実験に際して種々御助言いただいた東北薬科大学癌研究所榎原房夫助手に深謝する。さらに直接御指導いただいた当教室木村行雄講師に感謝する。

文 献

- 1) Kimura, Y. and Kisaki, N.: Urol. Int., **31**, 355, 1976.
- 2) Addis, T.: Harvey Lectures, **23**, 222, 1927—28.
- 3) Boyce, W.H., Gurvey, F.K. and Norflect, C.M.: J. Clin. Invest., **33**, 1287, 1954.
- 4) Gunton, R. and Burton, A.C.: J. Clin. Invest., **26**, 892, 1947.
- 5) Goddard, P.F. and Hobbs, J.R.: Proc. Roy. Soc. Med., **61**, 335, 1968.
- 6) Grant, G.H.: J. Clin. Path., **10**, 360, 1957.
- 7) Möerner, K.A.H.: Skandinav. Arch. F. Physiol., **6**, 332, 1895.
- 8) Tidstrøm, B.: Scand. J. Clin. and Lab. Invest., **15**, 259, 1963.
- 9) Berggård, I.: Clinica Chimica Acta, **6**, 413, 1961.
- 10) Rigas, D.A. and Heller, C.G.: J. Clin. Invest., **30**, 853, 1951.
- 11) Rowe, D.S. and Soothill, J.F.: Clin. Sci., **21**, 75, 1961.
- 12) Tidstrøm, B.: Acta. Med. Scand., **174**, 385, 1963.
- 13) Boyce, W.H.: Renal Stone Research Symposium, p. 181, J. and A. Churchill Ltd. London, 1969.

(1977年2月28日受付, 特別掲載)