尿 タ ン パ ク 質 の 研 究

——尿中に出現する低分子タンパクの検討——

Study on the Proteins in Urine

Study on the Low Molecular Weight Protein in Urine

只 野 壽 太 郎 *

JUTARO TADANO, M. D.

抄 録

尿中に出現するタンパク成分の大部分は、血漿中のそれに由来することは、1951年にRigasらにより報告され、現在約20種以上の免疫学的に異なるタンパクが尿中より同定されている。ただし腎糸球体はタンパク漏出に対し選択的に働くため尿中タンパクの分子量と血漿中のそれとの関係が追求されてきた。

この問題は、1959年から同62年頃にかけて徐々に明らかにされ、現在尿中タンパクの分子量は血漿中のものよりはるかに小さいものもあることが証明されている。一方、腎糸球体選択透過性の問題は尿タンパクと腎疾患との関係をより密接にし、Selectivity slope θ 値として、臨床上に応用されている。ただし selectivity 測定の基本である生体内タンパク、特に血漿中のタンパクの分子量別クリアランスには尿中低分子タンパクの存在を考慮していないため批判も多い。

本論文は尿中のタンパク質を免疫電気泳動法で分析し尿中に出現するタンパクのうち、Ig-G と Alb が特に正常人尿、患者尿のいずれにも出現することを認めた。つぎに尿中の Ig-G と Alb の分子量を分子量別分画法、超遠心分析法で測定し、

これらが血漿中のそれよりはるかに低分子化していることを明らかにすると同時に、低分子化していない Ig-G や Alb もある程度は尿中に漏出することを認めた。一方、この低分子化したタンパクは尿路中で尿に含まれる還元物質、酵素、細菌、細胞成分などの作用で産生されたものでなく、血漿中にあるものがそのまま尿中に漏出したことを示した。以上のような事実をもとにし、尿中の低分子化した Ig-G とそうでないものの比から、従来の selectivity 測定に準ずる、腎機能検査法の一つとして使いうるかどうかを検討した。すなわち、ネフローゼ症候群や慢性糸球体腎炎患者につき、selectivity slope θ 値を求めると共に、同時に尿中低分子 Ig-G とそうでないものの比を求め、両者を比較し相関が成立することを認めた。この方法は透析膜を使用し、操作法も簡単なので、日常の臨床検査室で充分利用できると考えた。ただし、より多くの臨床例の蓄積、病理組織学的所見との対比、治療効果や予後などとの関係につき将来検討を必要とする項目も多い。

緒 言

1836年、Bright らがタンパク尿と腎病変との関係を示して以来、腎疾患を尿タンパクの分析から探ろうとする試みがなされてきた。1951年 Rigas と Heller¹⁾ は正常人尿中のタンパクを電気泳動法で分析し、この方法が尿タンパク生成機序の解明や腎障害の程度をみる上で有力な方法であるばか

* 順天堂大学医学部講師（臨床病理学：現東海大学医学部助教授、臨床病理学）

Lecturer of Clinical Pathology, Juntendo University, School of Medicine.

〔Sept., 25, 1975 受付〕

りか、正常人尿中のタンパク分画比と血漿中のそれは類似し尿中タンパクの大部分は血漿由来であると報告した。しかしこのような分析法ではタンパク量や分画比の面からのみ尿タンパクが議論されたにすぎない。

免疫電気泳動法がこの領域に応用されると²³⁾、正常人尿中には種々の免疫学的に異なるタンパクが存在し、きわめて特異性の高い抗原抗体反応で微量のタンパクも検出できる利点から、尿タンパク研究の分野に新しい知見が得られた。

一方、尿タンパクの成因はその大部分が血漿由来で、量的・質的変動は腎系球体におけるタンパク透過性の亢進、尿細管での再吸収不全、血中のタンパク異常増加などによると説明され、Wallenius⁴⁾により実験的に証明された。しかし、血漿タンパクに対する腎系球体での選択的透過性の検討は、これまで尿タンパク分画の面からのみ追求⁵⁾され、分子量やサイズの検討は少ない。一方、Landis⁶⁾により提唱された“pore theory”が機能的には証明され、形態学的に観察されていなかった“pore”そのものも、Mislav⁷⁾や、Barman⁸⁾の研究から、その存在が明らかにされる可能性もあり、尿タンパクの分析は量や種類ばかりでなく分子量や形状の面からの追求が必要である。

さて、尿タンパクと腎疾患の関係をみる場合、尿路内のタンパクは、腎系球体通過時のままの形で、尿細管や尿路系での修飾は受けていないという条件が必要である。この点につき、Hardwick⁹⁾やGregoirie¹⁰⁾はネフローゼ患者尿中のアルブミン、トランスフェリン、 γ -グロブリンなどは尿細管で無選択的に再吸収されるだけで、質的な変化は基底膜から濾出される以前の状態にあるとした。1959年Franklin¹¹⁾は正常人尿中の γ -グロブリンは血漿中で変性や断裂を受け低分子化したものであることを示し、Merler¹²⁾はアルブミンについても同様な知見を発表した。しかし尿路系でタンパクは尿中の還元物質、酵素、細菌、細胞成分などの影響を受けることも考えられ、この点についてはさらに検討を進める必要がある。

この研究は、(1) 正常人・腎疾患患者尿中のタン

パクを免疫学的に分析し、(2) 特殊な透析膜でタンパクを分子量別に分画した。そして、(3) 尿中には血漿中のそれと抗原性が同じであるが、はるかに低分子化したものが存在することを明らかにし、(4) これが尿中で産生されたものでないことを示した。つぎに、(5) 超遠心分析法と分子量別分画法を併用し、低分子化したIg-Gとアルブミンの沈降定数、分子量、量的比を正常人・腎疾患について求め、(6) 腎系球体の選択的タンパク透過性算定に関する問題点を考察し、(7) 尿中Ig-Gの低分子化したものとしていないものの比を求め、これが腎障害の程度をスクリーニング的に判定する新しい方法として使いうることを示した。

実験材料

1) 正常人尿 健康成人男子で、既往歴に腎や尿路系の疾患のないものより24時間蓄尿を得た。尿は後述する方法^{付1)}でTamm-Horsfallタンパクを除き、4°Cで12時間保存しワットマン^{付2)} No. 7で不溶解成分と結晶成分を除いた。つぎに、日立18PR-3型分離用超遠心機を用い、1本のテフロン製分離容器に5mlずつの尿を入れ4°C、40,000回転で16時間遠心した。遠心後上層の4mlは捨て下層の1mlを試料^{付2)}とし、必要に応じコロジオンバッグで濃縮した。

2) タンパク尿 臨床的にネフローゼ症候群(以下N.S)と慢性系球体腎炎(以下C.G.N)の患者それぞれ3名より24時間蓄尿を得た。これをと同様な操作で処理したが、十分にタンパク量のあるものは分離用超遠心機は使用していない。

3) 血清 健康成人と2)の患者より採血し、無菌的に血清を分離した。健康人血清の一部はアミコン^{付2)}透過器を用い、透析膜UM-10で分子量 1×10^4 以上のタンパクを除いた。

付1) Tamm-Horsfall タンパクは、尿に結晶塩化ナトリウムを0.58 Mになるように加え、4°Cで6時間放置後20,000回転で20分間遠心し、沈殿物として除いた。

付2) コントロールとしてポンスー3 Rで着色した血清を尿に加え遠心すると、着色部分は下層の約0.5mlに集中しており、上層にはタンパク成分はない。

4) 除タンパク尿 正常人, N.S, C.G.N, S.L. E. の患者より得た尿を1)と同様に処理した. このあと, アミコン逕過器 M-400 と M-50 を用い, まず透析膜 UM-10 で分子量 1×10^4 以上のタンパクを除き, これを再び G-5T で逕過し, 0.5×10^4 以上のものを除いて試料とした.

上記の各試料 1)~4) を用い Table 1 に示した分析試料 1~8 を調整した.

5) 尿中 γ -グロブリン, アルブミンの沈降定数測定用試料 健康人男子 2 名, N.S 患者 3 名, C. G. N 患者 3 名より 24 時間蓄尿を得た. 1) と同様な方法で T. H タンパク, 不溶解成分, 結晶成分などを除き, 尿 1 l に 650 グラムの硫酸アンモニウムを入れ, 3,000 回転で 1 時間遠心した. 沈殿物を Visking tube No. 36 に入れ流水中で 24 時間透析し塩類を除き, 25% PVP でタンパク量 4 グラムまで濃縮した. この試料より透析膜で 5×10^4 以上のタンパクを除き, 澱粉ブロック電気泳動用試料とした. 泳動条件は pH 8.6, イオン強度 0.05 のペロナール緩衝液を用い 4°C 冷蔵室中で 2 mA/cm^2 の電流を 18 時間流した. 泳動後澱粉を 4 cm ほどのブロックに切り取り, タンパクを溶出し, 280 nm で O. D を測定した. このあとコントロールとして流した血清のアルブミン分画とグロブリン分画に相当する部分からの溶出液をコロジオンバッグで濃縮し, 超遠心分析用の試料とした.

6) Selectivity slope θ 算定用試料 正常人尿を Visking tube No. 36 に入れポリエチレングリコール 4000 で 2000 倍程度に濃縮し, T. H タンパク, 不溶解成分, 結晶成分を除いた. 患者尿も同様に処理したが, 最終的なタンパク量はコロジオンバックで 4 g/dl になるように調整した.

実験方法

1) 分子量別分画法 Pollak ら¹³⁾の方法によりアミコン逕過器 M-50 と M-400 を用いた. 透析膜は, XM-100, XM-50, UM-20, UM-10 を用い, N_2 ガス圧力 5 kg/cm^2 で加圧し, 4°C 冷蔵庫内で操作した. 分画の速さは 100 ml の試料が 6 時間で $5 \sim 10 \text{ ml}$ になるように調整し, すべて無菌的に行

なった. 分画の手順と逕液中のタンパクの分子量は Fig 1 に示した.

2) 免疫拡散法 Ouchterlony¹⁴⁾の方法に準じた. pH 8.6, イオン強度 0.006 のバルビタール緩衝液で免疫電気泳動用寒天を濃度 1.0% に溶解した. 抗血清はヘキスト社製のものをを用い被検試料を添加後, 室温に放置し 16 時間目と 40 時間目に沈降線を観察した.

3) 免疫電気泳動法 Williams と Grabar ら¹⁵⁾の方法によった. 寒天濃度, 緩衝液, 抗血清は 2) と同じである. 通電は 200 mV で 80 分行き, 抗血清を添加後 37°C で 16 時間反応させ沈降線を判読した.

4) 超遠心分析法 7 S, 4 S 分画については, Trautman ら¹⁶⁾の方法によった. 試料を pH 7.6, $1/15 \text{ M}$. リン酸緩衝液でタンパク濃度 0.5% にし, 日立 UM-1 型分析用超遠心機を用い, 60,000 回転, シュリーレン角度 70° , 測定温度 $25 \pm 0.2^\circ \text{C}$, アルミ標準セルを用いて分析した. シュリーレンパターンは 3 分おきに 5 枚, 15 分おきに 7 枚撮影した. 低分子のものは Crampton¹⁷⁾ らの方法によった. 溶媒に 6 M の尿素液と 0.2 M の KCl 液を用い, タンパク濃度 0.7%, 回転数 52,000 回転, シュリーレン角度 60° で分析し, 沈降線の明確になった時間 ($190 \sim 270$ 分) よりシュリーレンパターンを撮影した.

5) Sephadex G-200 による分析 $2.5 \times 100 \text{ cm}$ のカラムで pH 8.0, 0.1 M . NaCl, 0.03 M . リン酸カリウム緩衝液を用い, 1 時間に 3 ml の割合で流出分画した. 分画液は 1.5 ml ずつ採取し 280 nm で O. D を測定した.

6) Selectivity slope θ の算定 Soothill ら¹⁸⁾の方法によった. 被検者尿中と血清中のアルブミン, トランスフェリン, Ig-G, α_2 -マクログロブリン量を免疫学的に測定し各々の尿対血清比を求めた. この尿対血清比のトランスフェリン尿・血清比に対する割合をアルブミン, Ig-G, α_2 -マクログロブリンについて求め, 相対的タンパククリアランスとした. この数値を両対数グラフ上に横軸を分子量, 縦軸をタンパククリアランス値として

プロットし、回帰直線より θ 値を求めた。

7) 尿中の低分子分画と 4S, 7S 分画比の算定

a) 超遠心分析法によるもの：シュリーレンパターンより低分子タンパク分画, 4S・7S 分画の面積を求め、低分子分画を100としたときの4S, 7S 分画の相対比を求めた。b) 透析膜による方法：尿タンパクを透析膜で 5×10^4 以下と 10×10^4 以上の分画にわけ、免疫拡散法で各の分画中の Ig-G を測定し、 5×10^4 以下の Ig-G を 100 としたときの 10×10^4 以上の Ig-G の相対比を求めた。

実験結果

1) 正常人尿, N.S, C.G.N 患者の尿中タンパクの電気泳動の結果は Table 2, Fig 2~4 に示した。Alb, Cp, Ig-G^(付3) は正常人, 疾患群を問わず全例に見られた。疾患群に全例見出されて正常人に見られないものとして α_1 -Gc があるが, その他のタンパクは一定の出現傾向はなく, タンパク量と種類との間にも特に相関は認められない。

2) 尿タンパクを分子量別に分画し, その種類を免疫学的に見た結果は Table 3~5 に示した。正常人尿では血漿中の分子量が 6.9×10^4 の Alb と 16×10^4 の G が $2 \sim 1 \times 10^4$ 分画に, 10×10^4 の Hp と 9×10^4 の T_f が $5 \sim 2 \times 10^4$ 分画に認められた。N.S や C.G.N 患者尿では, T_f と Hp がいずれも $2 \sim 1 \times 10^4$ 分画に出現した。しかし分子量が 82×10^4 の α_2 M や 200×10^4 の L_p は低分子分画中には認められない。

3) 正常人尿, N.S, C.G.N 患者尿より分子量 0.5×10^4 以上のタンパクを除き, これにあらためて健康人血清を加え, 37°C 24時間無菌的に放置後尿中でのタンパクの変化を見たものを Table 6~8 に示した。いずれの試料も一致した沈降線の出現傾向を示した。すなわち, Alb と G が $2 \sim 1 \times 10^4$ 分画に, Hp と T_f が $5 \sim 2 \times 10^4$ 分画にまた分子量

16×10^4 の C_p が $10 \sim 5 \times 10^4$ 分画に認められた。

4) 0.85%の生理食塩液に健康人血清を 1:1 の割合で入れ, 24時間 37°C に放置し, 分子量別分画をした結果は Table 9 に示した。また $2 \sim 1 \times 10^4$ 分画の免疫電気泳動像を Fig 5 に示した。表示したごとく実験 3) の結果と一致した。すなわち Alb と G が $2 \sim 1 \times 10^4$ 分画に, また C_p, H_p, T_f がそれぞれ血漿中の分子量より低分子のものとして観察された。

5) 透析膜で, 血清より 2×10^4 以下のタンパクを除き, これを生理食塩液, 正常人尿, 正常人煮沸尿, 除タンパクした N.S, C.G.N, S.L.E 患者尿にそれぞれ加え, 37°C で 24時間放置後, Alb と G について沈降線の有無を見た結果を, Table 10, 11, Fig 6, 7 に示した。 $2 \sim 1 \times 10^4$ 分画にはタンパクは認められないが, $5 \sim 2 \times 10^4$ 分画には Alb と G が認められた。

6) 澱粉ブロック電気泳動で分画抽出したタンパクを 280nm で O.D を求めたものを Fig 8 に示した。尿タンパクの分画像はコントロールに比べ幅広く泳動されたため, Alb はブロック No. 17~22, Glob は No. 5~9 の抽出液を集め超遠心分析の試料とした。Fig 9 は Alb 分画より, Fig 10 は Glob 分画より得られた低分子タンパクのシュリーレンパターンである。ただしこのパターンでは沈降定数測定が困難なため, あらためて Crampton ら¹⁷⁾の方法による分析を行い, そのパターンを Fig 11, 12 に示した。

沈降定数は Alb 分画で $S_{20,\omega} = 2.2 \sim 1.8$, Glob 分画で $S_{20,\omega} = 2.2 \sim 1.6$ となり, 以後通常法で最後に出現する小ピークの沈降定数はこの値を参考にした。

7) 正常人尿と患者尿の 4S, 7S 分画の割合を示すシュリーレンパターンは Fig 13~15 に示した。

8) シュリーレンパターンより得られた正常人尿, N.S, C.G.N 患者尿中の低分子タンパク分画と 4S, 7S 分画の比とそれぞれの相対比は Table 12 に示した。正常人では低分子分画が 30~36% で 7S 分画は 4~5% である。これに対し疾患群で

付3) タンパクの略号は次の通りとする。Alb-アルブミン, A₁T-アンチトリプシン, Gc-グリコプロテイン, C_p-セルロプラスミン, H_p-ハプトグロビン, α_2 M- α_2 マクログロブリン, T_f-トランスフェリン, Hx-ヘモベキシン, L_p- β リポタンパク, I_gA=IA, I_gG=IG, I_gM=IM。

は、低分子分画が3~9%と減少し、7S分画が12~25%と増加している。低分子分画を100とした時の4S、7S分画の相対比も正常人では4S分画が158~199であるのに対し、疾患群では781~2086となり、7S分画も正常人が、13~26なのに対し、疾患群は122~617となった。Selectivity slope θ 値との関係でも相対比率の高いものほど θ 値は鋭角になり、腎糸球体基底膜の透過性亢進を示している。

9) 透析膜により Ig-G 分画を 5×10^4 以下と 10×10^4 以上に分け、低分子のものを100としたときの相対比を求めたものが Table 13 である。正常人では32~34であるのに対し、疾患群では93~212と高くなり、Selectivity slope θ 値との関係も結果8)とほぼ同様の傾向を示した。

10) N.S と C.G.N の患者より血清と尿をとり、その中に含まれる γ -G と、Alb の比を Sephadex G-200 で、また Ig-G と Alb の比を免疫学的方法で測定した結果を Table 14 に示した。分析方法により値は異なり、ほぼ一致した結果を示したものは6例中3例であった。

考 察

1957年 Grant ら²⁾は正常人尿中に抗ヒト血清と免疫学的に反応するタンパクが8~10種類あると報告した。現在では約20種以上のタンパクが正常人尿に見出されているが、その種類は報告者³⁾¹⁹⁾によりさまざまである。

この実験では、用いた12種類の抗血清に反応するタンパクが尿中に認められたが、出現した沈降線の数や種類は一定の傾向を示さなかった。出現頻度の多いタンパクは Alb, Cp, Hp, If, Ig-G で、これらはほぼ全例に見られ、Gc や Hx が次に多い。また α_2 -M や β -Lp などの高分子タンパクの見られた例もあるが、正常人尿と患者尿との間には著しい免疫電気泳動像の差はなく、また尿中のタンパク量と沈降線の数や種類に一定の関係は認められない。

しかし、特異抗血清を用い、各々のタンパクを確認すると、特に Alb に2~3本の沈降線を作る

例があった。

さて、腎糸球体の基底膜は heteroporous membrane とされ、 $26 \pm 2 \text{ \AA}$ と $41 \pm 13 \text{ \AA}$ の pore が 10,000 : 1 の割合で分布し、タンパクの漏出をその分子量により篩いわけしている。このため理論的には正常人尿中に出現するタンパクは分子量が $9 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ の範囲以下にあるとされている²⁰⁾。この実験でも分子量が 100×10^4 以上の Ig-M, α_2 -M, β -Lp などは正常人尿中には検出されず Franklin ら¹¹⁾の報告とも一致した。

血漿中の分子量をもとにし、各々の尿タンパクを分類すると $16 \times 10^4 \sim 10 \times 10^4$ の範囲にあるものでは Ig-G が正常人、患者尿のすべてに出現した。Peterson ら²¹⁾は Ig-G の腎クリアランスは Alb より多少低く、クリアランス比を 0.8 とした。しかし Ig-G の分子量は Alb の 2.5 倍あり、もし尿中 Ig-G の分子量が血漿中のそれと等しいならば、正常人の尿中には Ig-G は殆んど漏出せず、このクリアランス比はうなづけない。この問題につき、Berggard ら²²⁾は、1) 尿路系のどこかで Ig-G が分泌されている。2) 腎尿細管における Ig-G の再吸収が Alb に比べ著しく悪い。3) Ig-G が糸球体をポリペプチドの型で通過し、尿路系で再生されるという仮説を提出した。しかし現在、この考えは否定され、抗原性は血漿中のそれと同じであるが、よりサイズが小さなものが尿中に漏出するという説がほぼ認められつつある。分子量が 10×10^4 の Hp はポリペプチド鎖構成から、Hp 1-1, 1-2, 2-2 にわけられ、物理化学的に均一なものは Hp 1-1 である。尿中に出現したものがこのうちのどれであるかは確認できなかったが、ディスク電気泳動で一本のシャープなタンパク帯を形成しているため、Hp 1-1 かその亜型と考えた。

つぎに、分子量が $9 \times 10^4 \sim 4 \times 10^4$ の範囲では、Alb がすべてにみられた。尿中の Alb は血漿中のそれと等しい性状を持つとの報告¹²⁾もあるが、免疫学的に見ると沈降線数は検体により一定せず2~3本出現する例もあるので、抗原性は同じであるが物理化学的性質が異なる Alb が混在していると考えたい。この分子量の範囲には Tf, Hx,

Gcがある。TfのクリアランスはAlbよりやや低く、Gcはほぼ等しく、Hxはやや高いとされている。分子量の点から考えても、TfのHxがほぼ全例に認められたのは理解できる。しかし、Gcに関しては分子量こそ 4.4×10^4 と小さいが、正常人尿中の含有量が $0.03 \sim 0.07 \text{mg}/24\text{h}$ と少ないので、この実験方法では検出されなかったと考えた。

以上、正常人尿、患者尿の免疫電気泳動では種々のタンパクが出現したが、その種類や出現傾向は一定していない。また腎糸球体のタンパク透過性から考えても、尿中に出現しているタンパクは、たとえその起始が血漿であり、抗原性が同一でも、当然サイズの面では異なっているはずである。そこで、この実験では尿タンパクをPollackら¹³⁾の紹介したゲル状透析膜を用いる方法で分子量別に分画した。そして各々の分画滲液中のタンパクを免疫学的に同定し、間接的に分子量を求めると共に、低分子のAlbとIg-Gについては超遠心分析法で沈降定数を求めた。透析膜(Diaflo膜)は、膜そのものによるタンパクの破壊や変性はなく、回収率も良好であると報告¹³⁾されている。実際、この膜で血清を分画し得られた滲液につき超遠心分析法を行なったところ、分画前と等しい沈降定数が得られ、またディスク電気泳動や免疫拡散法によっても、その物理化学的性質や免疫学的性状に変化はなかった。

分子量別分画法と免疫電気泳動法を併用した実験では、血漿中の分子量が 6.9×10^4 のAlbと 16×10^4 のIg-Gが共に $2 \sim 1 \times 10^4$ の分画滲液中に見られた。1958年Webb²³⁾やFranklinら²⁴⁾は、正常人尿中のIg-Gは低分子であることを報告し、ついでBerggardら²⁵⁾は、このIg-Gが血漿中の7S Ig-Gの構成成分で、分子量が 3.5×10^4 にすぎないことを示した。1962年にSlaterら²⁶⁾は尿中の γ -Glob分画は単一ではなく、血漿中で様々に開裂したもので、その分子の大きさや形はそれぞれ異なるとした。また、また尿中のAlbにも同様の現象が観察され、Merlerら¹²⁾は沈降定数 2.6 ± 0.2 のAlbを尿中に認めている。これらのタンパクは血漿より尿中に漏出したものと考えられている

が、尿中にある還元物質、酵素、細菌、細胞成分なども無視できなく、いまだはっきりとした結論はつけられていない。

血清より $2 \sim 1 \times 10^4$ 以下のタンパクを除き、あらかじめ除タンパクした正常人尿、N.S, C.G.N患者尿と生理食塩液に入れ、無菌状態で 37°C 、12時間放置し、分子量別分画法でAlbとIg-Gの低分子化したものを検出しても $2 \sim 1 \times 10^4$ 分画滲液中にはタンパクは認められなかった。また、 $2 \sim 1 \times 10^4$ 以下のタンパクのみを入れた尿を 37°C 、12時間放置し、大型のタンパクの出現を見た実験でも、タンパクの大型化は認められなかった。つまり、低分子化した尿タンパクは尿中の様々な物質の影響により尿中で産生されたものでもなければ、腎をポリペプチドの形で通過した後、尿中で再生されたものでもないことがわかる。このように尿中タンパクの起始は血漿で、低分子化もすでに血漿中で起こっており、腎糸球体を通過した後、尿路系では何の変化も受けていないとすれば、この低分子タンパクの分析を腎糸球透過性の検査として使う可能性がある。すなわち、腎糸球体のporeは血中のタンパクを分子量別に篩いわけしており、これをもとにSelectivity slope θ を算定し、N.SやC.G.Nなどの腎疾患の程度や治療効果判定、予後の推定をしている。ただしSelectivity slope θ を求める尿中タンパクの分子量は血漿中のそれをそのまま使っており、低分子化したタンパクが尿中に認められている以上、この点を考慮する必要がある。またSelectivity slope θ を算出するためには数種類のタンパクの血漿中と尿中の量を求める必要もあり手技は必ずしも簡単とはいえない。そこで、この実験では正常人、患者尿中にすべて出現し、分子量別分画も容易で、かつ免疫学的同定も簡単なIg-Gに着目した。すなわち、従来の方法では低分子タンパクとしてAlbを、中程度のものとしてIg-Gを、また高分子タンパクとして $\alpha_2\text{-M}$ を指数としているが、本実験では低分子化したIg-Gとしていないものの比をとることにより、ある程度従来法にかわりうるデータが得られると考えた。

現在、尿タンパク分析の分野で最も興味を持たれているものは、腎疾患とくに N.S を中心とする尿中タンパクのクリアランス値、排泄量、および分子量との関係であろう。腎糸球体基底膜の pore で血漿タンパクが分子量別に篩い分けられていることは Wallenius⁴⁾ や、Hardwick ら⁹⁾ により実験的に証明され、腎のタンパクに対する選択性という概念となった。1964年 Joachim ら⁵⁾ は N.S を対象とし、各種タンパクのクリアランスを測定し、低分子タンパクと高分子タンパクとの間にはクリアランスに著しい差のあることを認めた。そしてこのうちでも尿中への排泄態度が比較的一定である Tf のクリアランスを基準とし、他のタンパクのクリアランスを $C_x/CTf \times 100 = \text{Transferrin Rx}$ の式で求めた結果、TfRx と各タンパクの分子量の間に両対数グラフ上で、ほぼ直線関係が成立することを知り、この直線の勾配 θ が腎糸球体での選択透過性の指標となることを報告した。しかしこの方法にはタンパクをいかに特異的に同定するかという点と尿中タンパクの分子量に血漿中のそれをあてはめている点に問題がある。第一の点については現在のところ、電気泳動法、免疫拡散法、ゲル濾過法などが行なわれているが、いずれも一長一短である。まず電気泳動法は致命的な欠陥がある。この方法によるタンパクの分析は次の理論によっている。タンパク粒子の荷電量を Q 、おかれた電場の強さを E とすると Stocks の法則により $QE = 6\pi\eta aV$ が成立し、タンパクの易動度 $\mu = \frac{V}{E} = \frac{Q}{6\pi\eta a}$ となる。つまり易動度は荷電量に比例し、粒子の大きさ a と粘度 η に反比例する。すなわちタンパクの易動度は単に分子量とは一次的に関係していないので電氣的易動度が等しくとも、分子量、荷電、分子の形などは等しいとはいえず、同一分画中に大きさのことなるタンパクが混在することが理論上からもわかる。このため電気泳動法によりタンパク分画はタンパクの分子量を指数とする Selectivity slope θ 値の算定には用いられない。

現在広く用いられている免疫学的方法では前述したごとく、血漿中のそれと同一の抗原性を示し

ても、分子量は異なるものもある。

また、Selectivity slope θ の算出に用いられる Alb, Ig-G, Tf, α_2 -M のうち前 3 者については、低分子化したものが尿中に出現しており、これを見無視して算出するわけにはいかない。古田³²⁾ によれば免疫拡散法で得られた Selectivity slope θ 値と腎の病理組織学的所見とは一致しない例が多く、特に障害が軽度なものではほとんど相関がないとした。

さて、分子篩効果を利用した Sephadex G-200 による方法は α -Glob と Alb はほぼ完全に分離できるが、その他のタンパクでは不明な点が多く、また分子量別に連続的な分離がむずかしい。尿と血漿中の γ -Glob と Alb の比を Sephadex G-200 で、また Ig-G と Alb の比を免疫学的方法で求めると、同一検体でその値が極端に異なる例がある。Amadeo ら²⁷⁾ は Sephadex G-200 で 11 種のタンパクにつき、尿・血漿比を求め θ 値を算定したところ、分子量の異なるタンパクが必ずしも直線関係を示さないばかりか、同一分子量のものでも種類によっては逆の結果になることを報告した。有村²⁸⁾ らは Sephadex G-200 と免疫拡散法で求めた θ 値はタンパク濃度が 1000 mg/24h 以上でないと相関しないことを報告し、Cameron ら²⁹⁾ もこのような分析は 2000mg/24h 以上のものを対象にすべきだとしている。

本実験に用いた超遠心分析法では正常人尿中の Glob 分画には $S_{20,\omega} = 1.6 \sim 2.2$ と $S_{20,\omega} = 6.2 \sim 6.4$ のものが、Alb 分画では $S_{20,\omega} = 1.8 \sim 2.1$ と $S_{20,\omega} = 4.2 \sim 4.7$ のものが見られた。

シュリーレンパターンによる量的比は、4 S 分画 58.4~61.1%、7 S 分画 4.8~8.2%、低分子分画 (Glob, Alb を含む) 30.7~36.8% であった。これに対し N.S や C.G.N 患者尿では、4 S 分画は 70.6~80.1% と増加し、7 S 分画も 12.0~25.3% となったが、低分子分画は逆に 3.6~9.8% に減少している。ただしこの値はあくまで相対的なものであり、尿中のタンパク量からすれば、患者尿中の低分子タンパクの絶対量が正常人よりも少ないことではない。また超遠心分析法では正確なタンパク量

を決めることがむずかしいので、ここでは低分子タンパクを100とした時の4S, 7S分画の相対比率を求めた。相対比率は正常人尿では低分子分画100に対し、4S分画は158~199, 7S分画は13~26であったが、N.Sでは4Sが1102~2086, 7Sが225~617と極端に大きくなり、別に求めた Selectivity slope θ とも良く相関している。またC.G.Nでも4Sが781~1430, 7Sが122~255と同様の結果となった。このように、尿中の低分子化したタンパクとそうでないものの比を求めることにより Selectivity slope 法にかわりうる腎機能の検査法に利用できると考えた。しかし、ここに用いた超遠心分析法は検体処理時間、技術的困難性、機械が高価であるなどの点から日常の臨床検査では利用されにくい。

これに対し透析膜を用いる分子量別分画法は、きわめて簡単な操作でタンパクを分子量別に分画できるばかりか、得られた成績も超遠心分析法にはほぼ一致するので、日常の臨床検査にも十分使い得ると考えた。すなわち、尿中のIg-Gを分子量 5×10^4 以下と 10×10^4 以上に分け、低分子のIg-Gを100とした時の相対的な比率を求める。値は正常人では32~34であったが、N.Sでは、179~209, C.G.Nでは93~212となり Selectivity slope θ 値とも比較的良く一致している。正常人の糸球体基底膜にあるporeはsmall sizeが主で、分子量の大きなタンパクにはbarrierとなり、小さなものから尿中に漏出する。しかし腎障害が起こると初めporeの拡大がおこり、つぎに基底膜の変性や肥厚などのためsmall sizeのporeが減少し、相対的にlarge sizeのporeが増加する。このため障害が起こるとその程度により高分子タンパクが漏出することは明らかで、 θ 値も理論的にはうなづける。ただし尿中に排泄されるタンパクは種類によっては、必ずしも分子量とクリアランス値が相関を示さない場合もある。つまり尿細管での

再吸収はタンパクにより差があり、無選択的に検査したタンパククリアランスからは正確な θ 値は得られない。Pollackら³⁰⁾は疾患腎では糸球体に断裂が生じ高分子のタンパクも無選択的に漏出するので、Selectivity slope θ を考える場合は、糸球体濾液中に存在するタンパクの比率がそのまま尿路系でも保たれている種類のタンパクをこれにあてべきだとしている。また、Sloan³¹⁾は実験的にAlb, Ig-G, Tfが尿細管の修飾を受けないタンパクであるとした。

つまり、ここに報告したIg-Gの低分子化したものと、していないものとの尿中比をとり、糸球体基底膜の障害を見る方法は新しい腎機能検査法として成立しうると考えた。ただしこの方法は血漿中での低分子タンパクの産生機序、得られた数値と病理組織所見との対比、障害の程度、治療効果、予後などとの関係など今後、検討を要する問題も多い。

結 論

尿中タンパク質を免疫電気泳動法、分子量別分画法、超遠心分析法で分析し次の結果を得た。①尿中には免疫学的に同定される種々のタンパクを含む。②このタンパクは種類や量に一定の傾向がなく出現するが、AlbとIg-Gは全例に見られた。③尿中タンパクの抗原性は血漿中のそれと同じであるが、はるかに低分子化したものが認められる。④低分子化したIg-Gとそうでないものの比をとると腎障害の程度が推定できる。⑤従来のSelectivity slope θ 値による方法は理論的にも操作法の面からも問題が多いが、ここに述べた分子量別分画法は簡単な操作で、これにかわりうる結果が期待できる。

この研究の要旨は第8回国際臨床病理学会（ドイツ、ミュンヘン市）で報告した。

表 1

試料 No.	分 析 試 料	分析法	分 析 目 的
1	正常人尿	SUF IEP DID UCA	正常人尿中のタンパクの分子量別分画, 免疫学的分類, 沈降定数測定
2	N. S, C. G. N 患者尿	SUF IEP DID UCA	N. S, C. G. N 尿中のタンパクの分子量別分画, 免疫学的分類, 沈降定数測定
3	タンパクを除いた正常人尿に血清を入れ 37°C 12時間放置	SUF IEP DID	正常人尿中に血清タンパクを変性させたり断裂させたりする因子が存在するかどうか
4	タンパクを除いたN. S, C. G. N, S. L. E 患者尿に血清を入れ37°C 12時間放置	SUF IEP DID	N. S, C. G. N, S. L. E 尿中に血清タンパクを変性させたり断裂させたりする因子が存在するかどうか
5	生理食塩液中に血清を加え37°C 12時間放置	SUF IEP DID	血清中にもともと低分子タンパクが含まれているかどうかのコントロール
6	2×10 ⁴ 以下のタンパクを除いた血清を 正常人尿, 煮沸尿, N. S, C. G. N, S. L. E 尿に加え37°C 24時間放置	SUF IEP DID	尿中でタンパクが低分子化するかどうかのコントロール
7	2×10 ⁴ 以下のタンパクのみを入れた正常人尿, 煮沸尿, N. S, C. G. N, S. L. E 尿を37°C 24時間放置	SUF IEP DID	尿中でポリペプチドが大型の分子に再生されるかどうかのコントロール
8	細菌 (E. Coli) と白血球を正常人尿に入れ, これに血清を加え37°C 24時間放置	SUF IEP	細菌や細胞がタンパクに与える影響を見る.

SUF: 分子量別分画法 IEP: 免疫電気泳動法 DID: 二重免疫拡散法 UCA: 超遠心分析法

表 2 Protein Identified in Human Urine
: Immunelectrophoresis

	Dx	Protein mg/dl	Alb	α^1		α^2			β			γ		
				A _T	G _C	C _P	H _P	M	T _f	H _x	L _P	A	G	M
1	Nephrotic Syndrome	95	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
2	"	120	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-
3	"	150	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
4	Chronic Glomerulo- nephritis	20	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
5	"	35	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
6	"	28	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-
7	Normal	< 3	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-
8	"	< 3	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-

表 3 Protein Identified in Urine
Method : Selective ultrafiltration+I.E.P
Sample : Concentrated human urine

[illegible]

表 4 Protein Identified in Urine
Method : Selective ultrafiltration+I.E.P Sample : Nephrotic syndrome

Molecular weight	Alb	α_1		α_2			β			γ		
		AT	Gc	Cp	Hp	M	Tf	Hx	Lp	A	G	M
in Serum by S.U	6.9	4.5	4.4	16	10	82	9	8	200	16	16	100
$\times 10^4$												
$>10 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10-5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
$5-2 \times 10^4$	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
$2-1 \times 10^4$	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
$<1 \times 10^4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 5 Protein Identified in Urine
Method : Selective ultrafiltration+I.E.P Sample : Chronic glomerulonephritis

Molecular weight	Alb	α_1		α_2			β			γ		
		AT	Gc	Cp	Hp	M	Tf	Hx	Lp	A	G	M
in Serum by S.U	6.9	4.5	4.4	16	10	82	9	8	200	16	16	100
$\times 10^4$												
$>10 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
$10-5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-
$5-2 \times 10^4$	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-
$2-1 \times 10^4$	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-
$<1 \times 10^4$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

表 6 Protein Identified in Urine
Method : Selective ultrafiltration+I.E.P Sample : Normal human urine

Molecular weight	Alb	α_1	α_2		β		γ	
		AT	Cp	Hp	Tf	Hx	A	G
in Serum by S.U	6.9	4.5	16	10	9	8	16	16
$\times 10^4$								
$>10 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	+	+
$10-5 \times 10^4$	+	+	+	+	+	+	-	+
$5-2 \times 10^4$	+	+	-	+	+	-	-	+
$2-1 \times 10^4$	+	-	-	-	-	-	-	+
$<1 \times 10^4$	-	-	-	-	-	-	-	-

表 10 Protein Identified in Urine

Method : Selective ultrafiltration+I.E.P

Sample : Human serum

Sample : Serum with	Selective ultrafiltration		Immunochemi- cal analysis
	5-2×10 ⁴	2-1×10 ⁴	
0.85% NaCl	+	-	Alb Ig-G
Urine from normal adult	+	-	Alb Ig-G
Boild urine from normal adult	+	-	Alb Ig-G

表 11 Protein Identified in Urine

Method : Selective ultrafiltration+I.E.P

Sample : Human serum

Sample : Serum with	Selective ultrafiltration		Immunochemi- cal analysis
	5-2×10 ⁴	2-1×10 ⁴	
Protein free urine from Nephrotic Syndrome pt	+	-	Alb Ig-G
Protein free urine from Chronic glomerulonep- hritis pt	+	-	Alb Ig-G
Protein free urine from S.L.E. pt	+	-	Alb Ig-G

表 12 Ultracentrifugal deterrmiation of urinary protein

Case \ Component	Low molecular		4 S		7 S		Selectivity θ
	%	Relative%	%	Relative%	%	Relative%	
Normal	34.2	100	60.7	177	5.1	14	—
	30.7		61.1	199	8.2	26	
	36.8		58.2	158	4.8	13	
N. S.	7.0	100	72.2	1102	15.8	225	72.01
	6.4		78.2	1221	15.4	240	70.41
	3.6		75.1	2086	23.3	591	42.50
	4.1		70.6	1721	25.3	617	48.16
C. G. N.	9.8	100	78.2	781	12.0	122	67.10
	6.8		79.6	1170	13.6	200	56.23
	8.4		76.4	909	15.2	180	55.81
	5.6		80.1	1430	14.3	255	42.25

表 13 Selective ultrafiltrative determination of urinary protein

Component Case	$< 5 \times 10^4$		$10 \times 10^4 <$		Selectivity θ
	Ig-G mg	Relative%	Ig-G mg	Relative %	
Normal	21.4	100	7.4	34	—
	30.6		9.8	32	
N. S.	64.1	100	114.9	179	49.21
	58.3		120.1	206	57.13
	106.4		222.6	209	67.55
	121.9		236.8	194	72.01
C. G. N.	46.3	100	198.1	212	47.10
	97.4		124.6	128	48.45
	100.3		130.2	130	59.98
	172.1		160.3	93	64.01

表 14 The relationship of urine/serum ratio

Ratio	Nephrotic Syndrome			Chronic glomerulonephritis		
(U/S Ig-G)/(U/S Albumin) Sephadex G-100	0.51	0.12	0.48	0.41	0.62	0.24
(U/S Ig-G)/(U/S Albumin) Immunodiffusion	0.07	0.03	0.36	0.35	1.51	0.49

Sample	Molecular weight of fractionated sample
Separation carried out in Diaflo filter	
fr. I	10×10^4
XM 100	
fr. II	$10 \sim 5 \times 10^4$
XM 50	
fr. III	$5 \sim 2 \times 10^4$
UM 20	
fr. IV	$2 \sim 1 \times 10^4$
UM 10	
fr. V	1×10^4

図 1 Molecular weight of fractionated sample carried out in Diaflo ultrafiltration membranes

図 2 IEP analysis of urine from Nephrotic syndrome patients

図 3 IEP analysis of urine from Chronic glomerulonephritis patients

図 4 IEP analysis of urine from normal adults

S : Serum U : Urine

図 5 IEP analysis of $2 \sim 1 \times 10^4$ fraction

図 6 IEP analysis of $2 \sim 1 \times 10^4$ fraction

図 7 IEP analysis of $5 \sim 2 \times 10^4$ fraction

図 8 Electrophoretic patterns of $5 \sim 2 \times 10^4$ fraction. Separation carried out in starch block

☒ 9 UCA patterns of Albumins. Separation carried out in starch block electrophoresis

☒ 13 UCA patterns of urines from healthy men

☒ 10 UCA patterns of γ -globulins. Separation carried out in starch block electrophoresis

☒ 14 UCA patterns of urines from nephrotic syndrom patients

☒ 11, 12 UCA patterns of low molecular weight protein by Crampton method

☒ 15 UCA patterns from Chronic glomerulonephritis patients

文 献

- 1) D. A. Rigas and C. G. Heller : The amount and nature of, urinary proteins in normal human subjects, *J. clin. Invest.*, **30**, 853~861, 1951.
- 2) C. H. Grant : The proteins of normal urine, *J. clin. Path.*, **10**, 360~368, 1957.
- 3) I. Berggard : Studies on the plasma proteins in normal human urine, *Clin. Chim. Acta.*, **6**, 413~429, 1961.
- 4) G. Wallenius : Renal clearance of dextran as a measure of glomerular permeability, *Acta Soc. Med.*, **4**, 152~158, 1958.
- 5) G. R. Joachim and J. S. Cameron et al : Selectivity of protein excretion in patients with the nephrotic syndrome, *J. clin. Invest.*, **43**, 2332~2346, 1964.
- 6) E. M. Landis and J. R. Pappenheimer : Handbook of Physiology. II. Circulation, p. 961, Amer. Physiol. Soc., Washington, 1963.
- 7) R. P. Misra and L. B. Berman : Studies on glomerular basement membrane II. Isolation and chemical analysis of diseased glomerular basement membrane, *J. Lab. Invest.*, **18**, 131~138, 1968.
- 8) R. P. Misra and L. B. Berman : Glomerular basement membrane : insights from molecular models, *Am. J. med.*, **47**, 337~339, 1969.
- 9) J. Hardwick and J. R. Squire : The relationship between plasma albumin concentration and protein excretion in patients with proteinuria, *Clin. Sci.*, **14**, 509~530, 1955.
- 10) F. Gregoire and C. Halmendier, et al : The mechanism of proteinuria and a study of the effects of hormonal therapy in the nephrotic syndrome, *Am. J. Med.*, **25**, 516~531, 1958.
- 11) E. C. Franklin : Physicochemical and immunologic studies of gamma globulins of normal human urine, *J. clin. Invest.*, **38**, 2159~2167, 1959.
- 12) M. Merler and J. S. Remington et al : Difference between urinary albumin and serum albumin : *Nature*, **196**, 1207~1208, December 22, 1962.
- 13) V. E. Pollak and M. Gaizutis et al : Serum protein in urine, Examination of new method for concentrating urine, *J. Lab. and Clin. Med.*, **71**, 338~344, 1968.
- 14) Ö. Ouchterlony : Antigen-antibody reactions in gels. IV. Types of reactions in coordinated systems of diffusion, *Acta path. microbiol. Scand.*, **32**, 230~240, 1953.
- 15) C. A. Williams and P. Grabar : Immuno-electrophoretic studies on serum protein, antigens of human serum, *J. Immunol.*, **74**, 397~403, 1955.
- 16) R. Trautman : Operating and comparing procedures facilitating Schlieren pattern analysis in analytical ultracentrifugation, *J. Phys. Chem.*, **60**, 1211~1218, 1956.
- 17) C. F. Crampton and R. Trautman : Application of the Archibald principle for the ultracentrifugal determination of the molecular weight in urea solutions of histone fractions from calf thymus, *J. Am. Chem. Soc.*, **81**, 4036~4040, 1959.
- 18) J. F. Soothill : Estimation of eight serum proteins by a gel diffusion precipitin technique, *J. Lab. Clin. Med.*, **59**, 859~870, 1962.
- 19) D. S. Rowe and J. F. Soothill : Serum protein in normal urine, *Clin. Sci.*, **21**, 75~85, 1961.
- 20) J. Hardwick : Renal disease, Ed. Black, Blackwell, Oxford. Edinbaragh, p. 252, 1968.
- 21) E. W. Peterson : Differentiation of glomerular, tubular and normal proteinuria ; Determination of urinary excretion of beta-2-macroglobulin, albumin and total protein, *J. clin. Invest.*, **48**, 1189~1198, 1969.
- 22) I. Berggard : The plasma proteins in normal urine, *Nature (London)*, **187**, 770~777, 1960.
- 23) T. Webb and B. Rose et al : Biocolloids in normal human urine, II, Physicochemical and immunochemical characteristics, *Canad. J. Biochem.*, **36**, 1159~1166, 1958.
- 24) E. C. Franklin and H. G. Kunkel : Immunologic differences between the 19S and 7S com-

- ponent of normal human γ -globulin, J. Immunol., **78**, 11~18, 1957.
- 25) I. Berggard : On a γ -globulin of low molecular weight in normal human plasma and urine, Clin. Chim. Acta, **6**, 545~549, 1961.
- 26) R. J. Slater and N. J. Obherty et al : The mechanism of postural proteinuria, Pediatrics, **190**, 26~31, 1960.
- 27) J. P. Amadeo and M. Gaizutis et al : Selectivity of the proteinuria; An evaluation of the immunochemical and gel filtration techniques, J. Lab. Clin. Med., **75**, 586~606, 1970.
- 28) 有村博行 : 腎糸球体基底膜の選択的蛋白透過性に関する研究 : 日腎誌, **9**, 459~467, 1967.
- 29) J. S. Cameron and G. Blandford : The simple assessment of permeability in heavy proteinuria, Lancet, **2**, 242~243, 1966.
- 30) V. E. Pollack : 5th International Cong. Nephrol. Symposium, Oct. 1972 (Mexico)
- 31) D. E. Sloan : 5th International cong. Nephrol. Symposium, Oct. 1972. (Mexico)
- 32) 古田 格 : 私信.

Summary

A Study of the Low Molecular Weight Urinary Protein

Urinary protein was obtained from 60 patients suffering from chronic nephritis, nephrotic syndrome, diabetes mellitus or pyelonephritis. The protein was fractionated (Diaflo filter paper) to be divided into proteins of different molecular size, those of less than 50,000 of M.W. and those of 50,000~100,000. Each protein fraction was examined by immunoelectrophoresis, single radial immunodiffusion techniques and ultracentrifugation. The proteins below 50,000, in M.W. consisted of albumin, α_1 -glycoprotein, transferrin and Ig-G. The proteins ranging from 50,000 to 100,000 consisted of albumin, and α_1 -glycoprotein.

The major constituents of the γ -globulin fraction in human urine appeared to be one fifth to one sixth of the serum γ -globulin in size and has coefficient of approximately 2.0S. This low molecular weight fragment of γ -globulin was antigenically closely related to serum 7S- γ -globulin. Also, the molecule size of the albumin in urine was about half of the serum albumin and showed a coefficient of approximately 1.8S. The possibility that the fractions represent naturally breakdown products of plasma proteins was discussed.

JUTARO TADANO, M. D.

*Lecturer of Clinical Pathology, Juntendo University, School of Medicine.
Associate Professor of Clinical Pathology, Tokai University, School of Medicine.*